

TRAITE D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 décembre 2000 (15.12.00)	Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB 99 AB CNR AMYL
Demande internationale no PCT/FR00/01384	Date de priorité (jour/mois/année) 21 mai 1999 (21.05.99)
Date du dépôt international (jour/mois/année) 19 mai 2000 (19.05.00)	
Déposant D'HULST, Christophe etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

13 octobre 2000 (13.10.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Kiwa Mpay
no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	no de téléphone: (41-22) 338.83.38

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 15 AUG 2001



WIPO PCT

Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB 99 CNRAMYL	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d' examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01384	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19/05/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 21/05/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/82		
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENT. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 13/10/2000	Date d'achèvement du présent rapport 13.08.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Ury, A N° de téléphone +49 89 2399 8411 

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17))*):

Description, pages:

1-45 version initiale

Revendications, N°:

1-19 version initiale

Dessins, feuilles:

1/8-8/8 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-21, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01384

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration :

Nouveauté	Oui : Revendications 1-19 (partiellement) Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications Non : Revendications 1-19
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-19 Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

Point V.

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: WO 98 14601 A (EXSEED GENETICS L L C) 9 avril 1998 (1998-04-09) cité dans la demande

D2: DATABASE SWISSPROT [en ligne] 1 août 1998 (1998-08-01) D'HULST, C., ET AL. : 'cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*' XP002146121

D3: DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY [en ligne] 2 juin 1998 (1998-06-02) D'HULST, C., ET AL. : 'cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*' XP002146137

- I) La présente demande est basée sur une méthode d'obtention de grains d'amidon contenant un polypeptide d'intérêt, ledit polypeptide d'intérêt étant véhiculé vers les plastes où a lieu la biosynthèse des grains d'amidons à l'aide d'un polypeptide de fusion entre ledit polypeptide d'intérêt et une amidon synthétase de type GBSSI (i.e. liée au grain d'amidon).
- Cette approche a déjà été utilisée dans l'art antérieur, en particulier D1 qui indique clairement que l'enzyme de choix est de type GBSSI (page 13, lignes 23-24).
- La différence entre la présente demande et D1 réside dans le fait que la présente demande utilise une GBSSI différente de celle de D1.
- La GBSSI selon la présente demande était identifiée dans l'art antérieur (voir D3 et D4) et donc clonable et utilisable comme simple variante par rapport à D1 (à noter également que D1 indique comment cloner de telles enzymes). Ainsi aucune activité inventive ne peut être reconnue sur la base de la GBSSI spécifique utilisée dans la présente demande.

Il apparaît à la lecture de la description (page 4, lignes 19-26) que l'activité inventive devrait être reconnue sur la base du procédé de transformation des plantes et d'obtention de grains d'amidon transformés par les séquences selon la demande. En d'autres termes sur la simple faisabilité de la méthode. Aucune activité inventive ne peut être reconnue sur cette base dans la mesure où d'une part la présente demande ne divulgue aucun procédé qui ne soit pas déjà

explicitement ou implicitement divulgué dans D1 et d'autre part compte tenu du fait que dès lors que la construction hybride de départ est définie, son utilisation pour transformer des plantes et obtenir des grains d'amidon contenant le peptide d'intérêt ne fait appel qu'à des opérations de routine bien connues de l'homme du métier.

En conséquence, l'objet des revendications 1-19 ne fait pas preuve d'activité inventive en vertu de l'Article 33.3 PCT.

- II) L'attention de la Demanderesse est par ailleurs portée sur le fait que de nombreuses revendications (1 et 8 par exemple) sont anticipées par D1 dès lors qu'elles se réfèrent à une "protéine dérivée" de l'amidon synthase ou dérivée de la GBSSI selon la présente demande (Article 33.2 PCT).

L
09/980771
Translation
5000

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference WOB 99 AB CNR AMYL	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01384	International filing date (day/month/year) 19 May 2000 (19.05.00)	Priority date (day/month/year) 21 May 1999 (21.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 13 October 2000 (13.10.00)	Date of completion of this report 13 August 2001 (13.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01384

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-45, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-19, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1/8-8/8, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-21, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-19 (in part)	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are referred to:

- D1: WO-A-98/14601 (EXSEED GENETICS L L C) 9 April 1998 (1998-04-09), cited in the application;
- D2: DATABASE SWISSPROT [on-line] 1 August 1998 (1998-08-01) D'HULST C. ET AL.: "Cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*", XP002146121;
- D3: DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY [on-line] 2 June 1998 (1998-06-02) D'HULST C. ET AL.: "Cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*", XP002146137.

- I) The present application is based on a method for obtaining starch grains containing a polypeptide of interest, said polypeptide of interest being conveyed towards the plastids where the biosynthesis of the starch grains occurs by means of a fusion polypeptide of the said polypeptide of interest and a starch synthetase of the GBSSI type (i.e. linked to the starch grain).

This approach has already been used in prior art, particularly in D1, which clearly indicates that the preferred enzyme is of the GBSSI type (page 13, lines

23-24). The difference between the present application and D1 lies in the fact that the present application uses a different GBSSI to that of D1.

The GBSSI of the present application was identified in the prior art (see D3 and D4) and could therefore be cloned and used as a straightforward alternative in relation to D1 (note also that D1 describes how to clone such enzymes). Consequently, no inventive step can be found on the basis of the specific GBSSI used in the present application.

The description (page 4, lines 19-26) suggests that an inventive step ought to be acknowledged on the basis of the method used to transform the plants and to obtain starch grains transformed by the sequences defined in the application. In other words, purely on the basis of the feasibility of the method. No inventive step can be recognised on this basis, firstly because the present application discloses no method that is not already explicitly or implicitly disclosed by D1, and secondly because of the fact that once the initial hybrid structure has been defined, the use thereof to transform plants and to obtain starch grains containing the peptide of interest merely involves routine steps that are well known to a person skilled in the art.

Consequently, the subject matter of Claims 1-19 involves no inventive step within the meaning of PCT Article 33(3).

- II) The applicant should also note that many of the claims (1 and 8, for example) are anticipated by D1 in so far as they refer to a "protein derived" from the starch synthetase or derived from the GBSSI as per the present application (PCT Article 33(2)).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: l'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

by fax and post

PCT

OPINION ECRITE

(règle 66 du PCT)

Destinataire:

DEMACHY, Charles
Grosset-Fournier & Demachy SARL
20, rue de Maubeuge
F-75009 Paris
FRANCE

21. MAI 2001

RECU

FAX: 0033 1 42 81 08 71

Date d'expédition
(jour/mois/année)

17.05.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
WOB 99 CNRAMYL

DELAI DE REPONSE 2 mois à compter
de la date d'expédition indiquée ci-dessus

Demande internationale n°
PCT/FR00/01384

Date du dépôt international (jour/mois/année)
19/05/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
21/05/1999

Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB
C12N15/82

Déposant

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENT. et al.

1. La présente opinion écrite est la **première** opinion de cette nature rédigée par l'administration chargée de l'examen préliminaire international.
2. La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base de l'opinion
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale
3. Le déposant est **invité à répondre** à la présente opinion.

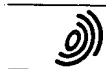
Quand? Voir le délai indiqué plus haut. Le déposant peut, avant l'expiration de ce délai, en demander la prorogation à l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 66.2.d).

Comment? En présentant une réponse par écrit, accompagnée le cas échéant, de modifications, conformément à la règle 66.3. Pour la forme et la langue des modifications, voir les règles 66.8 et 66.9.

En outre: Pour une possibilité additionnelle de présenter des modifications, voir la règle 66.4. Pour l'obligation faite à l'examinateur de prendre en considération des modifications ou des arguments, voir la règle 66.4 bis. Pour une communication officielle avec l'examinateur, voir la règle 66.6.

En l'absence de réponse, le rapport d'examen préliminaire international sera établi sur la base de la présente opinion.
4. La date limite d'établissement du rapport d'examen préliminaire international conformément à la règle 69.2 est le: 21/09/2001.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé / Examinateur

Ury, A

Agent des formalités (y compris prolongation de délais)

Emslander, S

N° de téléphone +49 89 2399 8718



I. Base de l'opinion

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans la présente opinion, comme "initialement déposées"*) :

Description, pages:

1-45 version initiale

Revendications, N°:

1-19 version initiale

Dessins, feuilles:

1/8-8/8 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-21, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté (N)	Revendications	
Activité inventive (IS)	Revendications	1-19 (NON)
Possibilité d'application industrielle (IA)	Revendications	

2. Citations et explications
voir feuille séparée

Point V.

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 98 14601 A (EXSEED GENETICS L L C) 9 avril 1998 (1998-04-09) cité dans la demande
- D2: DATABASE SWISSPROT [en ligne] 1 août 1998 (1998-08-01) D'HULST, C., ET AL. : 'cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*' XP002146121
- D3: DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY [en ligne] 2 juin 1998 (1998-06-02) D'HULST, C., ET AL. : 'cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*' XP002146137

- I) La présente demande est basée sur une méthode d'obtention de grains d'amidon contenant un polypeptide d'intérêt, ledit polypeptide d'intérêt étant véhiculé vers les plastes où a lieu la biosynthèse des grains d'amidons à l'aide d'un polypeptide de fusion entre ledit polypeptide d'intérêt et une amidon synthétase de type GBSSI (i.e. liée au grain d'amidon).

Cette approche a déjà été utilisée dans l'art antérieur, en particulier D1 qui indique clairement que l'enzyme de choix est de type GBSSI (page 13, lignes 23-24).

La différence entre la présente demande et D1 réside dans le fait que la présente demande utilise une GBSSI différente de celle de D1.

La GBSSI selon la présente demande était identifiée dans l'art antérieur (voir D3 et D4) et donc clonable et utilisable comme simple variante par rapport à D1 (à noter également que D1 indique comment cloner de telles enzymes). Ainsi aucune activité inventive ne peut être reconnue sur la base de la GBSSI spécifique utilisée dans la présente demande.

Il apparaît à la lecture de la description (page 4, lignes 19-26) que l'activité inventive devrait être reconnue sur la base du procédé de transformation des plantes et d'obtention de grains d'amidon transformés par les séquences selon la demande. En d'autres termes sur la simple faisabilité de la méthode. Aucune activité inventive ne peut être reconnue sur cette base dans la mesure où d'une part la présente demande ne divulgue aucun procédé qui ne soit pas déjà

explicitement ou implicitement divulgué dans D1 et d'autre part compte tenu du fait que dès lors que la construction hybride de départ est définie, son utilisation pour transformer des plantes et obtenir des grains d'amidon contenant le peptide d'intérêt ne fait appel qu'à des opérations de routine bien connues de l'homme du métier.

En conséquence, l'objet des revendications 1-19 ne fait pas preuve d'activité inventive en vertu de l'Article 33.3 PCT.

- II) L'attention de la Demanderesse est par ailleurs portée sur le fait que de nombreuses revendications (1 et 8 par exemple) sont anticipées par D1 dès lors qu'elles se réfèrent à une "protéine dérivée" de l'amidon synthase ou dérivée de la GBSSI selon la présente demande (Article 33.2 PCT).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

DEMACHY, Charles
Grosset-Fournier & Demachy SARL
20, rue de Maubeuge
F-75009 Paris
FRANCE

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 13.08.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
WOB 99 CNRAMYL

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR00/01384

Date du dépôt international (jour/mois/année)
19/05/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
21/05/1999

Déposant
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENT. et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.


4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international

 Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Neumann, M

Tél. +49 89 2399-7351



(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 novembre 2000 (30.11.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/71734 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 15/82,
9/10, 15/54, 15/62, C12Q 1/68, C12N 1/21, A01H 5/00

(74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Gros-
set-Fournier & Demachy Sarl, 20, rue de Maubeuge,
F-75009 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/01384

(22) Date de dépôt international: 19 mai 2000 (19.05.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/06494 21 mai 1999 (21.05.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris
Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): D'HULST,
Christophe [FR/FR]; 81, rue Pierre Cateau, F-59150
Wattrelos (FR). BALL, Steven [FR/FR]; 58, rue Molhant,
F-59830 Bourghelles (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: STARCH GRANULES CONTAINING A RECOMBINANT POLYPEPTIDE OF INTEREST, METHOD FOR OB-
TAINING SAME AND USES

(54) Titre: GRAINS D'AMIDON CONTENANT UN POLYPEPTIDE RECOMBINANT D'INTERÊT, LEUR PROCÉDE D'OB-
TENTION, ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns starch granules containing a hybrid polypeptide between a starch-synthase and a recombinant
polypeptide of interest, the nucleotide sequences used for obtaining same, methods for preparing them and their uses, particularly in
pharmaceutical compositions.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet des grains d'amidon contenant un polypeptide de fusion entre une amidon-synthé-
tase et un polypeptide recombinant d'intérêt, les séquences nucléotidiques utilisées pour leur obtention, leurs méthodes de préparation,
ainsi que leurs utilisations, notamment dans des compositions pharmaceutiques.

WO 00/71734 A1

GRAINS D'AMIDON CONTENANT UN POLYPEPTIDE RECOMBINANT D'INTERÊT, LEUR PROCÉDÉ D'OBTENTION, ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention a pour objet des grains d'amidon contenant un polypeptide recombinant d'intérêt, leur procédé d'obtention, ainsi que leurs utilisations, notamment dans des compositions pharmaceutiques.

L'amidon représente l'une des sources les plus importantes de polysaccharides présents sur terre, et peut notamment être trouvé dans les plantes (maïs, pomme de terre, blé, riz, orge...), les algues, les microalgues etc. L'amidon se présente sous forme de grains insolubles dans l'eau, dont la taille peut varier de 0,1 à plusieurs dizaines de μm de diamètre selon l'origine (plantes, algues ou microalgues) ou encore le génotype du végétal considéré. Ainsi, les tailles de ces grains varient de 0,1 μm de diamètre à plus de 50 μm de diamètre. De même, les degrés de cristallinité de ces grains oscillent entre 0% (pour les grains riches en amylose) à plus de 30%. Il existe trois à quatre types cristallins (A, B, C, V). Le grain croît par apposition de couches successivement amorphes et semi-cristallines à partir du centre du grain d'amidon.

L'amidon renferme plusieurs fractions polysaccharidiques distinctes, composées de glucanes liés en α -1,4 et ramifiés en α -1,6. Plus particulièrement, l'amidon est constitué de deux polymères de glucose : l'amylose d'une part, fraction minoritaire du grain (environ 20 à 30 % en poids), de faible poids moléculaire, modérément ramifié (< 1 % de liaisons α -1,6) et l'amylopectine d'autre part, fraction majoritaire du grain (70 à 80 % en poids), de haut poids moléculaire et fortement ramifiée (5 % de liaisons α -1,6). L'amylose n'est pas nécessaire à l'édification de la cristallinité du grain d'amidon ; on sait aujourd'hui que c'est l'amylopectine qui est responsable de la cristallinité du grain d'amidon.

Au plan biologique, l'amidon *sensu stricto* n'est retrouvé que dans le règne végétal, et, plus spécifiquement, dans les chloroplastes ou dans les plastes non photosynthétiques de la cellule végétale eucaryote. Deux types d'amidon peuvent être synthétisés par les végétaux : l'amidon transitoire ou photosynthétique (dont la synthèse se déroule au niveau des chloroplastes), et, l'amidon de réserve (dont la synthèse se déroule au niveau des amyloplastes).

La synthèse de l'amidon chez les plantes fait intervenir toute une panoplie d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du précurseur ADP-glucose, l'échafaudage des molécules d'amylose et d'amylopectine et enfin, la dégradation du grain d'amidon.

5 La première étape de la biosynthèse de l'amidon est la production du précurseur ADP-glucose qui fait intervenir deux enzymes : la phosphoglucomutase (PGM) et l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase).

10 La deuxième étape de la biosynthèse du grain d'amidon fait également intervenir deux types d'enzymes, principalement impliquées dans la synthèse de l'amylose et de l'amylopectine : les amidon-synthétases (ou adénosine diphosphate glucose α -1,4-glucane α -4-glucosyltransférases) et les enzymes de branchement (ou α -1,4-glucane-6-glucosyltransférases). Les amidon-synthétases catalysent le transfert du résidu de glucose de l'ADP-glucose sur des chaînes de glucanes en élongation en créant une liaison O-glycosidique de type α -1,4. Puis, les enzymes de branchement hydrolysent
15 une liaison α -1,4 d'un glucane en élongation, et soudent ensuite le fragment ainsi libéré sur le reste du glucane par l'intermédiaire d'une liaison α -1,6.

En ce qui concerne la dégradation de l'amidon, il existe deux familles majeures d'enzymes de dégradation : les enzymes hydrolytiques (hydrolases) d'une part, telles que les α -amylases (endomylases), les β -amylases (exomylases), les γ -amylases (amyloglucosidases), les D-enzymes (glucosyltransférases), les R-enzymes (enzymes de débranchement), les α -glucosidases (maltases), et, d'autre part, les enzymes phosphorolytiques (ou amidon-phosphorylases).
20

Plusieurs isoformes d'amidon-synthétases coexistent chez les plantes supérieures. La distinction majeure entre ces isoformes tient en leur caractère soluble (à savoir qu'elles sont en solution dans le stroma plastidial des plantes) ou lié au grain d'amidon.
25

Les amidon-synthétases liées au grain d'amidon (ou GBSS pour Granule Bound Starch Synthases) sont retrouvées en étroite association avec l'amidon. Plusieurs isoformes de GBSS ont été isolées chez le maïs, le pois, la pomme de terre ou encore le blé (MacDonald and Preiss, 1985 ; Smith, 1990 ; Dry et al., 1992 ; Denyer et al., 1995). Dans tous les cas, c'est la GBSSI qui représente l'isoforme majeure ; le rôle tenu par cette isoforme dans la biogenèse du grain d'amidon est la formation
30

d'amylose (Tsai, 1974 ; Hovenkamp-Hermelink et al., 1987 ; Delrue et al., 1992 ; Denyer et al., 1995). Une mutation aux loci WX des céréales, AMF de la pomme de terre, LAM du pois, associe la disparition de la GBSSI à un effondrement total de la fraction amylosique de l'amidon. Un ADNc correspondant à la « protéine Waxy » (par abus de langage, on utilise le terme « protéine Waxy » pour désigner la GBSSI chez les plantes, la distinguant ainsi des autres GBSS) a été isolé chez le blé, l'orge, le maïs, le riz, la pomme de terre et le pois. Les comparaisons des séquences protéiques relatives montrent une homologie très grande entre les diverses espèces (Ainsworth et al., 1993).

La GBSSI n'est pas la seule amidon-synthétase liée au grain d'amidon. D'autres isoformes sont retrouvées liées au grain d'amidon chez le pois, la pomme de terre, le maïs ou encore le blé (Smith, 1990 ; Dry et al., 1992 ; Mu et al., 1994 ; Denyer et al., 1995). Cependant, les rôles tenus par chacune de ces isoformes ne sont pas clairs jusqu'à présent. De plus, la plupart d'entre elles sont aussi retrouvées dans la phase soluble.

Les amidon-synthétases solubles (ou SS pour Soluble Starch Synthases) ne sont pas liées au grain d'amidon, mais sont retrouvées sous forme soluble dans le stroma plastidial des plantes. De même que pour les formes liées, de multiples formes d'amidon-synthétases solubles sont présentes chez les végétaux supérieurs. Ainsi, on a par exemple pu détecter trois isoformes d'amidon-synthétases solubles (SSI, SSII et SSIII) dans le tubercule de pomme de terre.

Des ADNc correspondants aux différentes formes d'amidon-synthétases solubles ont été clonés chez les végétaux supérieurs (Baba et al., 1993 ; Dry et al., 1992 ; Edwards et al., 1995 ; Abel et al., 1996 ; Marshall et al., 1996 ; Gao et al., 1998). La comparaison des séquences qui en découle, montre clairement la présence de trois régions hautement conservées à travers les isoformes, que ce soit au sein d'une même espèce ou entre les espèces de plantes supérieures.

Des travaux de recherche récents menés par les Inventeurs ont permis d'établir que la l'amidon-synthétase soluble II (SSII) de *Chlamydomonas reinhardtii* est principalement impliquée dans la formation des cristaux de la molécule d'amylopectine.

En revanche, la GBSSI n'intervient pas dans l'édification des cristaux de l'amylopectine. L'activité GBSSI n'a jamais été détectée en phase soluble. La GBSSI est intimement associée au grain d'amidon. Cependant, contrairement à l'amylase, aucun motif de liaison à l'amidon n'a été mis en évidence dans les séquences de GBSSI décrites jusqu'à présent. Ainsi on ne connaît pas le mécanisme régissant la liaison de la GBSSI au granule d'amidon.

Les amidon-synthétases suscitent un intérêt particulier dans la mesure où ces enzymes pourraient permettre de véhiculer un peptide recombinant d'intérêt vers les plastides où a lieu la biosynthèse des grains d'amidon. Ainsi la transformation de plantes avec des séquences codant pour des peptides de fusion entre une amidon-synthétase et un peptide d'intérêt, permettrait d'obtenir des grains d'amidon en grande quantité à partir desquels ledit peptide d'intérêt pourrait être récupéré.

C'est dans cet objectif que les auteurs de la demande internationale WO 98/14601 (Exseed Genetics), ont décrit des séquences nucléotidiques codant des protéines de fusion dans lesquelles le polypeptide d'intérêt est lié à l'extrémité aminoterminal d'une amidon-synthétase choisie dans le groupe constitué par les amidon-synthétases solubles I, II et III (SSI, SSII, SSIII), les amidons-synthétases liées au grain (GBSS), les enzymes de branchement I, IIa et IIBb et les glucoamylases. Toutefois aucun procédé de transformation de plantes à l'aide des séquences décrites dans cette demande, et donc d'obtention de grains d'amidon transformés par lesdites séquences, n'est illustré de façon détaillée.

La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs du fait que seule la transformation de plantes avec des séquences nucléotidiques codant des polypeptides de fusion dans lesquels le polypeptide d'intérêt est lié à l'extrémité carboxyterminale de l'amidon-synthétase, permet d'obtenir des grains d'amidon contenant ledit peptide d'intérêt.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouvelles séquences nucléotidiques codant des protéines de fusion capables de véhiculer un peptide d'intérêt vers le site de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales (y compris les cellules d'algues ou de micro-algues).

Un autre but de la présente invention est de fournir des plantes transformées à l'aide des séquences nucléotidiques susmentionnées, lesdites plantes produisant de l'amidon contenant un polypeptide d'intérêt.

Un autre but de la présente invention est de fournir des grains d'amidon contenant un polypeptide d'intérêt.

Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé de préparation de ces grains d'amidon.

Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé de préparation d'un polypeptide recombinant d'intérêt à partir de ces grains d'amidon.

Un autre but de la présente invention est de fournir, des compositions notamment alimentaires ou pharmaceutiques, contenant les grains d'amidon susmentionnés.

Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé de biotransformation des grains d'amidon lorsque ledit peptide d'intérêt utilisé est capable de transformer l'amidon.

L'invention sera illustrée dans ce qui suit à l'aide des figures suivantes :

- Figure 1 : ADNc codant pour la partie carboxyterminale de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- Figure 2 : ADNc codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, et séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*.

La présente invention a pour objet toute séquence nucléotidique recombinante caractérisée en ce qu'elle comprend, dans le sens 5'→3', une séquence nucléotidique codant pour une adénosine diphosphate glucose α -1,4-glucanase α -4-glucosyltransférase ou amidon-synthétase (EC 2.4.1.21), ou pour une protéine dérivée de cette enzyme, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite amidon-synthétase ou protéine dérivée ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique codant pour l'enzyme ou protéine susmentionnée étant placée en amont d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt.

Par amidon-synthétase, on entend dans ce qui précède et ce qui suit, toute protéine ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon

dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon, que cette amidon-synthétase ait conservé ou non son activité enzymatique au sein du polypeptide de fusion, codé par une séquence nucléotidique recombinante susmentionnée, entre ladite amidon-synthétase et ledit polypeptide d'intérêt.

De préférence, la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée telle que définie ci-dessus, est choisie parmi celles codant pour une amidon-synthétase liée au grain d'amidon GBSS présente notamment chez les plantes, algues ou micro-algues, et plus avantageusement encore pour une isoforme GBSSI, ou pour une protéine dérivée de cette GBSS, ou GBSSI, telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, et plus particulièrement pour une GBSS, notamment pour une GBSSI, est telle qu'obtenue par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules susceptibles de contenir cette enzyme, notamment de cellules de plantes, algues ou micro-algues, à l'aide d'un antisérum contenant des anticorps reconnaissant spécifiquement ladite amidon-synthétase codée par un ou plusieurs ADNc de la banque, lorsque ladite amidon-synthétase est exprimée par un vecteur de clonage approprié, ledit antisérum étant obtenu par immunisation d'un animal, tel que le lapin, avec de l'amidon extrait des cellules susmentionnées.

L'invention concerne plus particulièrement toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée, est choisie parmi :

- la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentés sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique :

- . codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* d'environ 640 à 680 acides aminés, notamment d'environ 660 acides aminés, dont l'extrémité aminoterminal correspond à l'enchaînement d'acides aminés suivant : ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV, ou ALDIVMVAAEVAPWSKTGGLGDV,

et dont l'extrémité carboxyterminale correspond à l'enchaînement d'acides aminés représenté sur la figure 1,

et étant obtenue par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'aide d'un antisérum obtenu par immunisation de lapins avec de l'amidon extrait des cellules susmentionnées de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- ou un fragment nucléotidique de l'ADNc susmentionné, codant pour un fragment peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ledit fragment peptidique comprenant l'intégralité de la partie aminoterminal de ladite GBSSI, et étant délimité à son extrémité carboxyterminale par l'acide aminé situé en l'une des positions 25 à 238, ou en l'une des positions 118 à 238, de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 1,

- ou une séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique de la séquence nucléotidique de l'ADNc susmentionné, ou d'un fragment nucléotidique susmentionné de cette dernière, et codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou pour un fragment peptidique susmentionné de cette dernière,

- ou une séquence nucléotidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment nucléotidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une séquence peptidique dérivée de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou dérivée d'un fragment peptidique susmentionné de cette dernière, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50 %, et de préférence d'au moins environ 70 %, avec la séquence ou fragment nucléotidique susmentionnés,

- ou une séquence nucléotidique susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments nucléotidiques susmentionnés, notamment dans les conditions stringentes d'hybridation définies ci-après,

la propriété que possède une amidon-synthétase, ou un fragment ou une protéine dérivée de cette dernière tels que définis ci-dessus, de pouvoir s'associer aux grains d'amidon, pouvant être mesurée selon la méthode suivante : extraction des protéines des grains d'amidon, par exemple selon le procédé détaillé ci-après, et détection de la

présence de ladite amidon-synthétase, ou d'un fragment ou d'une protéine dérivée de cette dernière tels que définis ci-dessus, notamment par électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode détaillée ci-après.

L'invention concerne plus particulièrement toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique susmentionnée codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée, est plus particulièrement choisie parmi :

- la séquence nucléotidique de l'ADNc représenté sur la figure 2, correspondant à SEQ ID NO : 1 dans la liste de séquences ci-après, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- tout fragment tel que défini ci-dessus de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 représentée sur la figure 2, et plus particulièrement toute séquence dont le nucléotide de l'extrémité 5' correspond à celui situé en l'une des positions 1 à 186 de SEQ ID NO : 1, et dont le nucléotide de l'extrémité 3' correspond à celui situé en l'une des positions 1499 à 3117 de SEQ ID NO : 1, notamment :

- . la séquence SEQ ID NO : 2 délimitée par les nucléotides situés aux positions 15 à 2138 de SEQ ID NO : 1, codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de pré-protéine de 708 acides aminés (SEQ ID NO : 3) délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 708 de la séquence peptidique représentée sur la figure 2,

- . la séquence SEQ ID NO : 4 délimitée par les nucléotides situés aux positions 186 à 2138 de SEQ ID NO : 1, codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de protéine mature de 651 acides aminés (SEQ ID NO : 5) délimitée par les acides aminés situés aux positions 58 et 708 de la séquence peptidique représentée sur la figure 2,

- . la séquence SEQ ID NO : 6 délimitée par les nucléotides situés aux positions 186 à 1499 de SEQ ID NO : 1, codant pour un fragment de 438 acides aminés (SEQ ID NO : 7) délimité par les acides aminés situés aux positions 58 et 495 de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* représentée sur la figure 2,

- . la séquence SEQ ID NO : 8 délimitée par les nucléotides situés aux positions 186 à 1778 de SEQ ID NO : 1, codant pour un fragment de 531 acides

aminés (SEQ ID NO : 9) délimité par les acides aminés situés aux positions 58 et 588 de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* représentée sur la figure 2,

- ou une séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique des séquences nucléotidiques susmentionnées, et codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou pour un fragment peptidique susmentionné de cette dernière,

- ou une séquence nucléotidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment nucléotidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une séquence peptidique dérivée de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou dérivée d'un fragment peptidique susmentionné de cette dernière, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50 %, et de préférence d'au moins environ 70 %, avec la séquence ou fragment nucléotidique susmentionnés,

- ou une séquence nucléotidique susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments nucléotidiques susmentionnés, notamment dans les conditions stringentes d'hybridation définies ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt est choisie parmi celles codant des peptides biologiquement actifs, notamment des peptides d'intérêt thérapeutique ou utilisables dans le domaine agroalimentaire.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt est choisie parmi celles codant des enzymes susceptibles de transformer l'amidon, telles que les enzymes interagissant avec les α -glucanes dont les hydrolases diverses, les phosphorylases, les α -1,4 glucanotransférases, les enzymes de branchement, les amylases, et notamment les hydrolases thermostables issues de bactéries extrémophiles telles que les archaebactéries actives à des températures supérieures à 40 °C.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique codant pour un site de clivage, ladite séquence nucléotidique étant placée entre la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, et la séquence nucléotidique codant le polypeptide d'intérêt.

A titre d'illustration, la séquence nucléotidique codant pour un site de clivage est choisie parmi les séquences codant pour une séquence peptidique de type aspartyl-proline très labile en pH acide, ou codant pour une petite séquence peptidique reconnue spécifiquement par une protéase, telles que la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine, la collagénase, la thrombine, l'alasubtilisine, ou reconnue par des composés chimiques tel que le bromure de cyanogène.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend un promoteur situé en amont de la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, ainsi qu'une séquence codant pour des signaux de terminaison de la transcription située en aval de la séquence nucléotidique codant le polypeptide d'intérêt.

Parmi les promoteurs de transcription susceptibles de pouvoir être utilisés dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- pour les promoteurs procaryotes, les promoteurs Lac ou T7,
- pour les promoteurs eucaryotes de type végétaux supérieurs, le promoteur 35S CaMV, ou tout type de promoteur d'origine végétale,
- dans le cas de la transformation de microalgues, le promoteur utilisé peut être celui du gène *ARG7* codant l'arginosuccinate lyase ou encore le promoteur du gène *NTI1* codant la nitrate réductase.

L'invention a également pour objet tout vecteur recombinant, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique recombinante selon l'invention telle que définie ci-dessus, insérée en un site non essentiel pour sa réplication.

L'invention concerne également tout hôte cellulaire, transformé par un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus, notamment toute bactérie telle que

Agrobacterium tumefaciens, et comprenant au moins une séquence nucléotidique recombinante selon l'invention.

L'invention concerne également tout polypeptide de fusion caractérisé en ce qu'il comprend :

5 - en position N-terminale une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette enzyme, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite amidon-synthétase ou protéine dérivée ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon,

10 - et, en position C-terminale, un peptide ou polypeptide d'intérêt, la partie C-terminale de la séquence en acides aminés de l'amidon-synthétase, ou de la protéine dérivée, étant ainsi liée à la partie N-terminale de la séquence peptidique d'intérêt, ledit polypeptide de fusion étant codé par une séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus selon l'invention.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend en position N-terminale une GBSS présente notamment chez les plantes, algues ou micro-algues, et plus particulièrement une isoforme GBSSI, ou une protéine dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus.

20 L'invention concerne plus particulièrement tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'amidon-synthétase est choisie parmi :

 - la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* d'environ 640 à 680 acides aminés, dont l'extrémité aminoterminal correspond à l'enchaînement d'acides aminés suivant: ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV, ou ALDIVMVAAEVAPWSKTGGLGDV, et
25 l'extrémité carboxyterminale correspond à l'enchaînement d'acides aminés représenté sur la figure 1, ladite GBSSI étant codée par la séquence nucléotidique obtenue par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'aide d'un antisérum obtenu par immunisation de lapins avec de l'amidon extrait des cellules susmentionnées de *Chlamydomonas reinhardtii*,

30 - ou un fragment peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ledit fragment peptidique comprenant l'intégralité de la partie aminoterminal de ladite GBSSI, et étant délimité à son extrémité carboxyterminale par l'acide aminé situé en

l'une des positions 25 à 238, ou en l'une des positions 118 à 238, de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 1,

- ou une séquence peptidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment peptidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence peptidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avantageusement d'au moins environ 80%, avec la séquence ou fragment peptidique susmentionnés,

la propriété que possède la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ou un fragment ou une protéine dérivée de cette dernière tels que définis ci-dessus, de pouvoir s'associer aux grains d'amidon, pouvant être mesurée selon la méthode décrite ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement, pour objet tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'amidon-synthétase définie ci-dessus, est plus particulièrement choisie parmi :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 3 délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 à 708 de la figure 2, correspondant à la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de pré-protéine de 708 acides aminés,

- tout fragment tel que défini ci-dessus de la séquence peptidique SEQ ID NO : 3 représentée sur la figure 2, et plus particulièrement toute séquence dont l'acide aminé de l'extrémité aminoterminal correspond à celui situé en l'une des positions 1 à 58 de SEQ ID NO : 3, et dont l'acide aminé de l'extrémité carboxyterminale correspond à celui situé en l'une des positions 495 à 708 de SEQ ID NO : 3, notamment :

. la séquence SEQ ID NO : 5 délimitée par les acides aminés situés aux positions 58 à 708 de SEQ ID NO : 3, correspondant à la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de protéine mature de 651 acides aminés,

. la séquence SEQ ID NO : 7 délimitée par les acides aminés situés aux positions 58 à 495 de SEQ ID NO : 3, correspondant à un fragment de 438 acides aminés de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* représentée sur la figure 2,

la séquence SEQ ID NO : 9 délimitée par les acides aminés situés aux positions 58 à 588 de SEQ ID NO : 3, correspondant à un fragment de 531 acides aminés de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* représentée sur la figure 2,

5 - ou une séquence peptidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment peptidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence peptidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avantageusement d'au moins environ 80%, avec la séquence ou
10 fragment peptidique susmentionnés,

la propriété que possède la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ou un fragment ou une protéine dérivée de cette dernière tels que définis ci-dessus, de pouvoir s'associer aux grains d'amidon, pouvant être mesurée selon la méthode décrite ci-dessus.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le polypeptide d'intérêt est choisi parmi les peptides biologiquement actifs, notamment les peptides d'intérêt thérapeutique ou utilisables dans le domaine agroalimentaire.

L'invention concerne également tout polypeptide de fusion tel que défini ci-
20 dessus, caractérisé en ce que le polypeptide d'intérêt est choisi parmi les enzymes susceptibles de transformer l'amidon, telles que les enzymes interagissant avec les α -glucanes dont les hydrolases diverses, les phosphorylases, les α -1,4 glucanotransférases, les enzymes de branchement, les amylases, et notamment les hydrolases thermostables issues de bactéries extrémophiles telles que les
25 archaebactéries actives à des températures supérieures à 40 °C.

L'invention a également pour objet tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un site de clivage, tel que décrit ci-dessus, placé entre d'une part l'amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, et, d'autre part, le polypeptide d'intérêt.

30 L'invention concerne également les cellules végétales transformées génétiquement, contenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques recombinantes telles que décrites ci-dessus, intégrées dans leur génome ou maintenues de manière

stable dans leur cytoplasme, lesdites cellules végétales étant choisies parmi les cellules de plantes, d'algues ou de micro-algues, capables de fabriquer de l'amidon.

L'invention vise également les cellules végétales transgéniques telles que décrites ci-dessus contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion définis ci-dessus au sein des grains d'amidon contenus dans lesdites cellules végétales.

L'invention a plus particulièrement pour objet les cellules végétales transgéniques susmentionnées, transformées avec une séquence nucléotidique recombinante contenant la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentées sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* décrite ci-dessus, ou contenant un fragment ou une séquence dérivée tels que décrits ci-dessus de l'ADNc susmentionné.

L'invention concerne plus particulièrement encore les cellules végétales transgéniques susmentionnées, transformées avec :

- la séquence nucléotidique de l'ADNc représenté sur la figure 2, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,
- tout fragment tel que défini ci-dessus de la séquence nucléotidique représentée sur la figure 2,
- ou une séquence nucléotidique dérivée, telle que définie ci-dessus, des séquences nucléotidiques susmentionnées,
- ou une séquence nucléotidique susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments nucléotidiques susmentionnés, notamment dans les conditions stringentes d'hybridation définies ci-dessus.

L'invention a également pour objet les plantes, algues ou micro-algues transformées génétiquement, ou parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, semences, ou fragments de ces plantes, algues ou micro-algues, comprenant au moins une séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus intégrée dans le génome ou maintenue de manière stable dans le cytoplasme des cellules les composant.

L'invention vise également les plantes, algues ou micro-algues transformées génétiquement, ou parties, ou fragments de ces plantes, algues ou micro-algues, tels que définis ci-dessus, contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que décrits

ci-dessus au sein des grains d'amidon contenus dans les cellules végétales les composant.

Parmi les plantes, algues ou micro-algues transformées dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement le blé, le maïs, la pomme de terre, le riz, l'orge, l'amarante, les algues du genre *Chlamydomonas*, notamment *Chlamydomonas reinhardtii*, les algues du genre *Chlorella*, notamment *Chlorella vulgaris*, ou les algues unicellulaires du genre *Dunaliella* (telles que décrites dans l'ouvrage "*Dunaliella* : Physiology, Biochemistry, and Biotechnology (1992), Mordhay Avron and Ami Ben-Amotz Editeurs, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA").

L'invention a plus particulièrement pour objet les plantes, algues ou micro-algues transgéniques susmentionnées, transformées avec une séquence nucléotidique recombinante contenant la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentées sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* décrite ci-dessus, ou contenant un fragment ou une séquence dérivée tels que décrits ci-dessus de l'ADNc susmentionné.

L'invention concerne plus particulièrement encore les plantes, algues ou micro-algues transgéniques susmentionnées, transformées avec :

- la séquence nucléotidique de l'ADNc représenté sur la figure 2, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,
- tout fragment tel que défini ci-dessus de la séquence nucléotidique représentée sur la figure 2,
- ou une séquence nucléotidique dérivée, telle que définie ci-dessus, des séquences nucléotidiques susmentionnées,
- ou une séquence nucléotidique susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments nucléotidiques susmentionnés, notamment dans les conditions stringentes d'hybridation définies ci-dessus.

L'invention concerne également les grains d'amidon caractérisés en ce qu'ils comprennent un ou plusieurs polypeptides de fusion définis ci-dessus, lesdits grains d'amidon étant encore désignés par l'expression "grains d'amidon transformés" ou "glucosomes".

L'invention a plus particulièrement pour objet les grains d'amidon susmentionnés comprenant un polypeptide de fusion défini ci-dessus, ledit polypeptide de fusion contenant la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* d'environ 640 à 680 acides aminés décrite ci-dessus, dont l'extrémité aminoterminal correspond à l'enchaînement d'acides aminés suivant : ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV, ou ALDIVMVAAEVAPWSKTGGLGDV, et l'extrémité carboxyterminale correspond à l'enchaînement d'acides aminés représenté sur la figure 1, ou un fragment ou un polypeptide dérivé tels que décrits ci-dessus de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*.

L'invention concerne plus particulièrement les grains d'amidon susmentionnés comprenant un polypeptide de fusion défini ci-dessus, ledit polypeptide de fusion contenant la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 à 708 de la figure 2, codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de préprotéine de 708 acides aminés, ou tout fragment tel que défini ci-dessus de la séquence peptidique représentée sur la figure 2, notamment toute séquence dont l'acide aminé de l'extrémité aminoterminal correspond à celui situé en l'une des positions 1 à 58 de la figure 2, et dont l'acide aminé de l'extrémité carboxyterminale correspond à celui situé en l'une des positions 495 à 708 de la figure 2, tel que les fragments mentionnés ci-dessus

Avantageusement, les grains d'amidon susmentionnés sont caractérisés en ce qu'ils ont un diamètre compris entre environ 0,1 μm et quelques dizaines de μm , et en ce que la proportion en poids des polypeptides de fusion dans ces grains est comprise entre environ 0,1 % et 1 %.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des grains d'amidon transformés tels que définis ci-dessus, le cas échéant en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, lesdits grains contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion possédant un effet thérapeutique déterminé.

Avantageusement les compositions pharmaceutiques susmentionnées de l'invention se présentent sous une forme administrable par voie parentérale, notamment par voie intraveineuse, ou sous une forme administrable par voie orale.

De préférence, les compositions pharmaceutiques susmentionnées administrables par voie parentérale, sont caractérisées en ce que le diamètre des grains d'amidon est compris entre environ 0,1 μm et plusieurs μm , notamment entre environ 0,1 μm et 10 μm , et en ce que la proportion en poids des polypeptides de fusion dans ces grains est comprise entre environ 0,1 % et 1 %.

Des grains d'amidon tels que décrits ci-dessus dont les faibles diamètres sont compris entre environ 0,1 μm et environ 10 μm , et dans lesquels la proportion en poids des polypeptides de fusion est comprise entre environ 0,1 % et 1 %, sont avantageusement obtenus :

- à partir de plantes ou cellules de plantes transformées dans le cadre de la présente invention et choisies pour leur propriété à produire naturellement les grains d'amidon susmentionnés, lesdites plantes étant choisies notamment parmi le riz, l'amarante,

- ou à partir de parties de plantes transformées dans le cadre de la présente invention, lesdites parties de ces plantes produisant naturellement les grains d'amidon susmentionnés, telles que les feuilles des plantes,

- ou à partir de plantes ou cellules de plantes transformées dans le cadre de la présente invention, ces plantes étant choisies parmi des plantes comportant des mutations telles qu'elles produisent des grains d'amidon de faibles diamètres susmentionnés, notamment à partir des plantes mutantes décrites dans Buléon A. et al., 1998,

- ou à partir de plantes ou cellules de plantes transformées dans le cadre de la présente invention, ces plantes étant choisies parmi des plantes transformées à l'aide de séquences nucléotidiques antisens de tout ou partie du gène codant pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase nécessaire à la synthèse d'ADP-glucose dans les cellules végétales, notamment à partir des plantes transformées décrites dans l'article de Müller-Röber B. et al., 1992.

Avantageusement, dans le cas de compositions pharmaceutiques susmentionnées administrables par voie parentérale, les grains d'amidon sont de préférence choisis parmi ceux de structure amorphe dans le cas où l'on souhaite obtenir une libération rapide du polypeptide de fusion qu'ils contiennent dans le sang du patient, ou, au

contraire parmi ceux de structure cristalline lorsque l'on souhaite libérer progressivement le polypeptide de fusion dans le sang.

A titre d'illustration, des grains d'amidon amorphes peuvent être obtenus à partir de semences transformées selon l'invention en phase de germination, ou à partir
5 de plantes mutantes particulières telles que décrites par Shannon J. et Garwood D., 1984, notamment à partir des cultivars mutants tels que "amylose extender" du maïs ou encore tous les cultivars mutants de plantes, algues ou micro-algues dont l'amidon est enrichi en amylose.

Les grains d'amidon selon l'invention de structure cristalline, présentent
10 avantageusement environ 30 à 35% de cristaux, et peuvent être obtenus à partir de semences de plantes, notamment de céréales, venant d'être récoltées et à maturité, ou à partir de plantes mutantes telles que décrites par Shannon J. et Garwood D., 1984, notamment à partir des cultivars mutants tels que "waxy" du maïs ou encore tous les cultivars mutants de plantes, algues ou micro-algues dont l'amidon est dépourvu
15 d'amylose.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, le cas échéant en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion possédant un effet
20 thérapeutique déterminé.

L'invention concerne également toute composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend des grains d'amidon transformés tels que définis ci-dessus, lesdits grains contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion étant utilisable dans le domaine
25 agroalimentaire.

L'invention a également pour objet toute composition alimentaire telle que décrite ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion étant utilisable dans le domaine agroalimentaire.

La présente invention concerne également tout procédé d'obtention de cellules
30 végétales (de plantes, algues ou micro-algues), et, le cas échéant de plantes, algues ou

micro-algues entières, transformées par au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la transformation de cellules végétales, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules, ou à maintenir de manière stable dans leur cytoplasme, une ou plusieurs séquences nucléotidiques recombinantes selon l'invention, et mise en culture *in vitro* de ces cellules transformées,

- le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées.

Selon un mode de réalisation du procédé susmentionné de l'invention, la transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert de la séquence nucléotidique recombinante de l'invention dans les protoplastes, notamment après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylène glycol (PEG) en présence de cations divalents (Ca^{2+}) selon la méthode décrite dans l'article de Krens *et al.*, 1982.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de Fromm *et al.*, 1986.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes de séquences nucléotidiques recombinantes selon l'invention, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de Sanford, 1988.

Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire telle que décrite dans l'article de De La Penna *et al.*, 1987.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé susmentionné de l'invention, les cellules végétales sont transformées par mise en présence de ces dernières avec un hôte cellulaire transformé par un vecteur selon l'invention, tel que décrit ci-dessus, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome ou le maintien de manière stable dans le cytoplasme de ces dernières, des séquences nucléotidiques recombinantes de l'invention initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon les méthodes décrites dans les articles de Bevan, 1984 et

d'An *et al.*, 1986, ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin *et al.*, 1987.

Parmi les cellules végétales susceptibles d'être transformées dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement les cellules de blé, maïs, pomme de terre, riz, orge, amarante, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chorella vulgaris*.

Selon un mode de réalisation du procédé susmentionné de l'invention, les cellules végétales transformées selon l'invention, sont cultivées *in vitro*, notamment en bioréacteurs selon la méthode décrite dans l'article de Brodelius, 1988, en milieu liquide, ou selon la méthode décrite dans l'article de Brodelius *et al.*, 1979, sous forme immobilisées, ou encore selon la méthode décrite dans l'article de Deno *et al.*, 1987, procédant par culture de racines transformées *in vitro*.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé susmentionné de l'invention, la transformation de cellules végétales est suivie par une étape d'obtention de plantes transformées par mise en culture desdites cellules transformées dans un milieu approprié, et, le cas échéant, fécondation et récupération des semences des plantes obtenues à l'étape précédente, et mise en culture de ces semences pour l'obtention de plantes de génération suivante.

Les semences transformées selon l'invention sont récoltées à partir de plantes transformées susmentionnées, ces plantes étant soit celles de la génération T0, à savoir celles obtenues à partir de culture de cellules transformées de l'invention sur un milieu approprié, soit avantageusement celles des générations suivantes (T1, T2 etc.) obtenues par autofécondation des plantes de la génération précédente et dans lesquelles les séquences nucléotidiques recombinantes de l'invention se reproduisent selon les lois de Mendel, ou les lois de l'hérédité extrachromosomique.

L'invention concerne également un procédé de préparation de grains d'amidon transformés tels que décrits ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'extraction des grains d'amidon à partir de cellules végétales transformées ou de plantes, ou de parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou de fragments de ces plantes, transformées susmentionnées, notamment par sédimentation dans les conditions décrites ci-après.

De préférence, les grains d'amidon selon l'invention sont tels qu'obtenus par extraction à partir de plantes, algues ou micro-algues, transformées décrites ci-dessus,

ou à partir de parties, ou de fragments de ces plantes, algues ou micro-algues, définies ci-dessus, notamment par sédimentation dans les conditions décrites ci-après.

Les plantes transformées utilisées pour la récupération des grains d'amidon sont celles de la génération T0, ou avantageusement celles des générations suivantes (T1, T2 etc.) susmentionnées.

L'invention concerne également un procédé de préparation de polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de récupération, et le cas échéant de purification, des polypeptides de fusion à partir des grains d'amidon transformés susmentionnés, notamment dans les conditions décrites ci-après.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un peptide d'intérêt caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus d'obtention de cellules végétales ou de plantes transformées selon l'invention, ledit procédé étant effectué par transformation de cellules végétales avec des séquences nucléotidiques susmentionnées codant pour un polypeptide de fusion contenant un site de clivage tel que décrit ci-dessus, et comprend une étape supplémentaire de clivage dudit polypeptide de fusion, à l'aide d'un réactif approprié, puis, le cas échéant, une étape de purification du polypeptide d'intérêt.

L'invention concerne également un procédé de biotransformation de grains d'amidon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- transformation de cellules végétales telles que définies ci-dessus à l'aide de cellules hôtes décrites ci-dessus contenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques codant pour des enzymes susceptibles de transformer l'amidon susmentionnées,

- obtention de plantes, algues ou micro-algues transformées de manière à ce que leur génome contienne une ou plusieurs séquences nucléotidiques décrites ci-dessus, par culture *in vitro* des cellules végétales transformées susmentionnées,

- le cas échéant, fécondation et récupération des semences des plantes obtenues à l'étape précédente, et mise en culture de ces semences pour l'obtention de plantes de génération suivante,

- extraction des grains d'amidon à partir des plantes, algues ou micro-algues, ou de parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou de fragments de ces plantes, algues ou micro-algues transformées susmentionnées, notamment par sédimentation dans les conditions décrites ci-après,

- le cas échéant, chauffage desdits grains d'amidon à une température à laquelle le peptide d'intérêt du polypeptide de fusion susmentionné est susceptible d'être actif.

De préférence, lorsque les procédés décrits ci-dessus sont réalisés par transformation de cellules de plantes, ces dernières sont transformées avec des séquences recombinantes susmentionnées contenant la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentées sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* décrite ci-dessus, et plus particulièrement avec des séquences recombinantes susmentionnées contenant la séquence nucléotidique représentée sur la figure 2, ou contenant un fragment ou une séquence dérivée tels que décrits ci-dessus de la séquence nucléotidique représentée sur la figure 2. L'utilisation de telles séquences recombinantes contenant la séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* décrite ci-dessus, permet avantageusement d'éviter l'apparition de phénomènes de co-suppression chez les plantes transformées ainsi obtenues.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'anticorps reconnaissant spécifiquement une amidon synthétase liée au grain d'amidon, d'une plante, algue ou micro-algue déterminée, par immunisation d'un animal, notamment d'un lapin, avec de l'amidon provenant de ladite plante, algue ou micro-algue.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation d'anticorps reconnaissant spécifiquement la GBSSI, d'une plante, algue ou micro-algue déterminée, par immunisation d'un animal, notamment d'un lapin, avec de l'amidon provenant de ladite plante, algue ou micro-algue.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore un procédé de préparation d'anticorps reconnaissant spécifiquement une isoforme de GBSS autre que la GBSSI, d'une plante, algue ou micro-algue déterminée, par immunisation d'un animal, notamment d'un lapin, avec de l'amidon provenant de ladite plante, algue ou micro-algue comportant une mutation telle que l'expression de la GBSSI est réprimée, par exemple une mutation choisie parmi les suivantes : *sta2-29::ARG7* chez *Chlamydomonas reinhardtii* (décrite par Delrue et al., 1992, susmentionné), *amf* chez la pomme de terre (décrite par Hovenkamp-Hermelink et al., 1987, susmentionné),

wx chez le maïs, le riz et le blé (décrite par Tsai., 1974, susmentionné), lam chez le pois (décrite par Denyer et al., 1995, susmentionné).

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention de l'amidon synthétase, telle que la GBSS, et plus particulièrement pour l'isoforme GBSSI, d'une
5 plante, algue ou micro-algue déterminée, par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules de ladite plante, algue ou micro-algue déterminée, susceptibles de contenir cette enzyme, à l'aide d'un antisérum contenant des anticorps reconnaissant spécifiquement ladite enzyme codée par un ou plusieurs ADNc de la banque, lorsque ladite enzyme est exprimée par un vecteur de clonage approprié, ledit antisérum étant
10 obtenu selon le procédé susmentionné.

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée, choisies parmi :

- la séquence nucléotidique de l'ADNc représenté sur la figure 2, correspondant à SEQ ID NO : 1 dans la liste de séquences ci-après, ladite séquence nucléotidique
15 codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- tout fragment tel que défini ci-dessus de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 représentée sur la figure 2, et plus particulièrement toute séquence dont le nucléotide de l'extrémité 5' correspond à celui situé en l'une des positions 1 à 186 de SEQ ID NO : 1, et dont le nucléotide de l'extrémité 3' correspond à celui situé en
20 l'une des positions 1499 à 3117 de SEQ ID NO : 1, notamment :

- . la séquence SEQ ID NO : 2 délimitée par les nucléotides situés aux positions 15 à 2138 de SEQ ID NO : 1, codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de pré-protéine de 708 acides aminés (SEQ ID NO : 3) délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 et 708 de la séquence peptidique
25 représentée sur la figure 2,

- . la séquence SEQ ID NO : 4 délimitée par les nucléotides situés aux positions 186 à 2138 de SEQ ID NO : 1, codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de protéine mature de 651 acides aminés SEQ ID NO : 5) délimitée par les acides aminés situés aux positions 58 et 708 de la séquence
30 peptidique représentée sur la figure 2,

- . la séquence SEQ ID NO : 6 délimitée par les nucléotides situés aux positions 186 à 1499 de SEQ ID NO : 1, codant pour un fragment de 438 acides

aminés (SEQ ID NO : 7) délimité par les acides aminés situés aux positions 58 et 495 de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* représentée sur la figure 2,

la séquence SEQ ID NO : 8 délimitée par les nucléotides situés aux positions 186 à 1778 de SEQ ID NO : 1, codant pour un fragment de 531 acides aminés (SEQ ID NO : 9) délimité par les acides aminés situés aux positions 58 et 588 de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* représentée sur la figure 2,

- ou une séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique des séquences nucléotidiques susmentionnées, et codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou pour un fragment peptidique susmentionné de cette dernière,

- ou une séquence nucléotidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment nucléotidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une séquence peptidique dérivée de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou dérivée d'un fragment peptidique susmentionné de cette dernière, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50 %, et de préférence d'au moins environ 70 %, avec la séquence ou fragment nucléotidique susmentionnés,

- ou une séquence nucléotidique susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments nucléotidiques susmentionnés, notamment dans les conditions stringentes d'hybridation définies ci-dessus.

L'invention a également pour objet les polypeptides choisis parmi :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 3 délimitée par les acides aminés situés aux positions 1 à 708 de la figure 2, correspondant à la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de pré-protéine de 708 acides aminés,

- tout fragment tel que défini ci-dessus de la séquence peptidique SEQ ID NO : 3 représentée sur la figure 2, et plus particulièrement toute séquence dont l'acide aminé de l'extrémité aminoterminal correspond à celui situé en l'une des positions 1 à 58 de SEQ ID NO : 3, et dont l'acide aminé de l'extrémité carboxyterminale

correspond à celui situé en l'une des positions 495 à 708 de SEQ ID NO : 3, notamment :

la séquence SEQ ID NO : 5 délimitée par les acides aminés situés aux positions 58 à 708 de SEQ ID NO : 3, correspondant à la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de protéine mature de 651 acides aminés,

la séquence SEQ ID NO : 7 délimitée par les acides aminés situés aux positions 58 à 495 de SEQ ID NO : 3, correspondant à un fragment de 438 acides aminés de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* représentée sur la figure 2,

la séquence SEQ ID NO : 9 délimitée par les acides aminés situés aux positions 58 à 588 de SEQ ID NO : 3, correspondant à un fragment de 531 acides aminés de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* représentée sur la figure 2,

- ou une séquence peptidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment peptidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence peptidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avantageusement d'au moins environ 80%, avec la séquence ou fragment peptidique susmentionnés,

la propriété que possède la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ou un fragment ou une protéine dérivée de cette dernière tels que définis ci-dessus, de pouvoir s'associer aux grains d'amidon, pouvant être mesurée selon la méthode décrite ci-dessus.

L'invention a également pour objet les anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, dirigés contre les polypeptides susmentionnés.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du clonage du gène codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, et de l'obtention de grains d'amidon transformés contenant un polypeptide de fusion avec ladite GBSSI, ainsi qu'à l'aide de la figure 1 représentant la séquence nucléotidique et la séquence protéique déduite de l'insert ADNc du clone CD142 codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*. (la séquence soulignée correspond à une des trois

régions hautement conservées à travers toutes les amidon- et glycogène- synthétases et intervient probablement dans la fixation du substrat ADP-glucose).

I) Clonage des séquences d'ADNc (ADN complémentaire) et d'ADNg (ADN génomique) correspondant au gène de structure de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*.

A) Clonage de l'ADNc

La stratégie développée afin de cloner l'ADNc correspondant au gène de structure de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* fait appel au criblage d'une banque d'expression à l'aide d'un antisérum polyclonal. L'antisérum est capable de reconnaître une séquence polypeptidique codée par un ADNc exprimé depuis un vecteur de clonage adéquat.

a) Production de l'antisérum

Afin de produire un antisérum susceptible de reconnaître spécifiquement la GBSSI de *C. reinhardtii*, l'amidon provenant de la souche sauvage (137C) a été injecté à trois reprises à un lapin hybride néo-zélandais albinos. Lors d'une expérience similaire, c'est l'amidon résiduel d'une souche double mutante aux loci *STA2* et *STA3* (IJ2) qui a été injecté au lapin dans les mêmes conditions.

Protocoles détaillés :

- Génotypes des souches de *C. reinhardtii* :

137C : *mt-nit1 nit2*

IJ2 : *mt-nit1 nit2 sta2-29::ARG7 sta3-1*

La souche 137C constitue la souche de référence pour toutes les études du métabolisme de l'amidon effectuées chez *C. reinhardtii*. La souche IJ2 a été entièrement décrite par Maddelein et coll. en 1994. Dans cette souche double mutante aux loci *STA2* et *STA3*, les activités GBSSI et SSII sont simultanément absentes. La mutation au locus *STA2* a été générée par interruption génique à l'aide du plasmide pARG7 (Maddelein et coll., 1994) et conduit à la disparition totale de la GBSSI du

grain d'amidon, alors que l'allèle mutant du gène *ST43* a été engendré par mutagenèse aux rayons X (Fontaine et coll., 1993).

- Conditions de culture, extraction et purification de l'amidon : les cellules sont mises en culture pendant 3 jours dans le milieu TAP en lumière continue (3000 lux) à partir d'un inoculum de 5×10^4 cellules/ml. La culture principale est stoppée alors que la concentration cellulaire atteint environ 2×10^6 cellules/ml.

Composition du milieu TAP (valeurs pour un litre de milieu) :

NH ₄ Cl.....	0,40 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	22 mg
Tris.....	2,40 g	H ₃ BO ₃	11,4 mg
KH ₂ PO ₄	0,32 g	MnCl ₂ .4H ₂ O.....	5,1 mg
K ₂ HPO ₄	1,47 g	FeSO ₄ .7H ₂ O.....	4,2 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,05 g	MoO ₃	1,8 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,30 g	CoCl ₂ .6H ₂ O.....	1,6 mg
EDTA.....	50 mg	CuO ₄ .5H ₂ O.....	1,6 mg

Le pH du milieu est ajusté à 7 par de l'acide acétique glacial

Le milieu TAP-N présente la même composition de base, mais ce milieu se distingue du premier par l'absence d'azote apporté sous forme de chlorure d'ammonium, remplacé par le chlorure de sodium à la même concentration ; c'est dans ces conditions de culture que les cellules accumulent une quantité d'amidon représentant jusqu'à vingt fois celle de cellules cultivées en milieu TAP. Dans ce cas, la culture est menée pendant 5 jours en lumière continue à partir d'une culture inoculée à 5×10^5 cellules/ml.

Les cellules sont ensuite concentrées par centrifugation à $2-4 \times 10^8$ cellules/ml (tampon Tris/acétate pH 7,5 50 mM ; EDTA 10 mM ; DTT 2,5 mM) puis soumises à l'action de la presse de French à 10000 psi. L'extrait obtenu en sortie de presse est centrifugé à 5000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot qui contient l'amidon est remis en suspension dans un volume d'eau, auquel sont rajoutés neuf volumes de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suède) avant d'être centrifugé à 10000 g pendant 30 min à 4°C. Le Percoll forme un gradient de densité lors de la centrifugation. L'amidon qui est très dense (sa densité est de 1,3 à 1,5) sédimente au fond du tube alors que les lipides

et autres débris cellulaires de faible densité forment une « capsule » à la surface du gradient de Percoll. Le culot d'amidon est ensuite rincé trois fois par de l'eau désionisée puis conservé à 4°C après l'avoir débarrassé du dernier surnageant de rinçage.

5 - Conditions d'immunisation du lapin, prélèvement et préparation de l'antisérum : le lapin utilisé lors de cette expérience est un lapin hybride néo-zélandais albinos. Trois injections successives espacées de trois semaines ont été effectuées avec 20 mg d'amidon purifié en suspension dans 500 µl d'eau. A cette suspension, sont rajoutés 500 µl de l'adjuvant de Freud standard. Le sang du lapin a été prélevé 3
10 semaines après l'ultime injection. Le sérum est préparé par simple centrifugation du sang après 24 heures de coagulation à 4°C. Les antiséras générés par les injections des amidons des souches 137C et IJ2 sont identifiés par les dénominations « antisérum SA137C » et « antisérum SAIJ2 » respectivement dans ce qui suit.

15 b) Préparation et criblage de la banque d'ADNc

La banque d'ADNc a été produite à partir des ARNm purifiés de la souche sauvage de *C. reinhardtii*. C'est le vecteur d'expression λ ZAP qui a été utilisé

Protocoles détaillés :

20 - Préparation des ARN totaux de *C. reinhardtii* : cette méthode est une adaptation de celle utilisée pour extraire les ARN des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Les cellules d'une culture de 1-2 x 10⁶ cellules/ml sont récoltées par centrifugation à 3500 g pendant 15 min à 4°C. Les cellules sont ensuite réparties en aliquotes d'un volume d'environ 200 µl. A ce stade, les cellules sont congelées dans l'azote liquide et
25 peuvent être conservées à -80°C pour plusieurs mois. A ces 200 µl de cellules congelées sont ajoutés 400 µl du tampon « Z6 » de composition suivante :

Tampon Z6 :	MES/NaOH pH 7,0	20 mM
	EDTA	20 mM
	Guanidine-HCl	6 M
30	β-mercaptoéthanol	100 µM.

Le mélange est très fortement agité pendant plusieurs minutes, puis 400 µl du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25v/24v/1v) sont additionnés et le

mélange est de nouveau fortement agité pendant plusieurs minutes. Le tout est centrifugé à 13000 g pendant 10 min à 4°C. Après avoir récupéré puis estimé le volume du surnageant, on y ajoute 1/20 de volume d'acide acétique à 1 M ainsi que 0,7 volumes d'éthanol 100%. On laisse le temps aux acides nucléiques de précipiter à -20°C pendant au moins 30 min. Après centrifugation à 13000 g pendant 15 min à 4°C, le culot est resuspendu dans 400 µl d'acétate de sodium à 3 M pH 5,6 puis centrifugé 10 min à 13000 g à 4°C. Le culot est alors rincé deux fois avec de l'éthanol à 70%, séché et enfin dissout dans 50 µl d'eau traitée au DEPC. La quantité d'acides nucléiques est estimée au spectrophotomètre à 260 nm ($DO_{260}=1$ équivaut à environ 40 µg/ml d'acides nucléiques).

- Construction d'une banque d'ADNc dans le vecteur λ ZAP : les ARN dotés d'une queue polyA (les ARNm en particulier) sont isolés de la préparation d'ARN totaux grâce au kit « polyATtract mRNA isolation systems » commercialisé par Promega (Madison, WI, USA). La synthèse des ADNc, la ligation dans le vecteur ZAP et l'empaquetage dans les capsides sont effectués avec l'aide du kit « cDNA synthesis kit, ZAP-cDNA synthesis kit and ZAP-cDNA gigapack II gold cloning kit » commercialisé par Stratagene (La Jolla, CA, USA). Le protocole suivi correspond au manuel d'instruction fourni avec le kit.

- Criblage immunologique d'une banque d'ADNc dans un vecteur d'expression : le criblage de la banque d'expression d'ADNc λ ZAP de *C. reinhardtii* a été réalisé par l'utilisation de l'antisérum préalablement obtenu (voir supra). Environ 100000 plaques de lyse sont étalées par la technique du Top-agar sur plusieurs boîtes de pétri contenant du milieu de croissance bactérien et l'antibiotique adapté. Après 3 heures d'incubation à 37°C, des filtres de nitrocellulose (Protan BA 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) préalablement plongés dans une solution d'IPTG 10 mM et séchés, sont appliqués à la surface du Top-agar. Les boîtes sont à nouveau incubées pendant 3 heures à 37°C avant d'être placées 30 min à 4°C. Les filtres de nitrocellulose sont alors délicatement retirés de la surface gélosée. Lors du criblage de la banque λZAP c'est la souche d'*E. coli* XL1-blue qui a été utilisée. Le protocole de révélation des filtres est alors le même que celui utilisé lors de l'étude en Western Blot (voir le chapitre concernant le Western Blot).

Les plages de lyse positives sont soumises à deux séries successives de criblage par le même antisérum afin de confirmer leur caractère positif, mais aussi pour les purifier. Lorsqu'une plage de lyse se révèle positive à la fin des trois tours de criblage, la séquence du plasmide pBluescript SK+ contenant l'insert d'intérêt est excisée du phage λ *in vivo*. C'est le phage « ExAssist helper phage » qui est utilisé pour la cotransfection de la souche SOLR avec le phage λ ZAP. On obtient ainsi un phagemide qui est utilisé pour l'infection de la souche XL1-Blue MRF' conduisant à la restitution du plasmide double brin pBluescript SK+ porteur de l'ADNc d'intérêt.

Un tel criblage mené avec l'antisérum SA137C a conduit à l'obtention d'un unique clone positif après trois tours de criblage. Nous avons dénommé ce clone par « CD142 ». L'insert du clone CD142 possède une taille de 1696 pb (voir la séquence sur la figure 1).

c) Analyse de la séquence de l'insert du clone CD142

Lorsqu'on interroge les banques de séquences protéiques avec celle déduite du clone d'ADNc « CD142 », les similitudes les plus importantes sont obtenues avec les GBSSI des plantes supérieures. Cette première indication sur l'origine de cet ADNc est renforcée par la présence d'une extension de 119 aminoacides (environ 14 kDa) en position carboxy-terminale de la séquence codante, par rapport aux principales GBSSI des plantes supérieures. En effet, le poids moléculaire de la GBSSI de *C. reinhardtii*, estimé par SDS-PAGE, est en moyenne de 10 à 15 kDa supérieur à ceux des protéines correspondantes chez les végétaux. L'extension de 119 aminoacides pourrait expliquer cette différence de poids moléculaire entre les GBSSI d'origines différentes. Prise séparément, cette extension de la séquence codante ne partage aucune similitude avec d'autres types de séquences polypeptidiques déjà connues.

La présence du codon stop UAA en position 717 signale le début d'une très longue région non codante de 946 pb. Très fréquentes dans les gènes nucléaires de *Chlamydomonas*, ces régions non codantes en position 3' terminale, semblent être surtout destinées à stabiliser le messager.

B) Clonage de l'ADNg

L'ADNg relatif au clone CD142 a été isolé après criblage d'une banque indexée d'ADNg dans des cosmides (Zhang et coll., 1994). Construite dans un vecteur cosmidique dérivé de c2RB, cette banque d'ADNg est contenue dans 120 plaques de microtitration de 96 puits. Chaque puits (sauf deux afin de faciliter l'orientation de la plaque) contient un clone bactérien transportant un unique cosmide. L'ensemble de la banque représente ainsi 11280 clones dont la taille moyenne des inserts avoisine 38 kb. Le génome nucléaire de *C. reinhardtii* y est donc statistiquement représenté environ quatre fois.

Le criblage de cette banque avec une sonde correspondant au clone CD142 a conduit à l'isolement un clone d'ADN génomique dénommé 18B1. L'insert présent dans cet unique cosmide a été analysé plus en détail. Après restriction par NotI puis hybridation avec la sonde CD142, seule une bande d'environ 9 kb reste positive, indiquant que toute l'information correspondant au clone CD142 est présente dans ce fragment. La séquence génomique correspondant au clone CD142 est présentée ci dessous.

Protocoles détaillés :

- Préparation des filtres de nylon pour le criblage : les filtres de nylon (Hybond N, Amersham Buchler, Braunschweig, Allemagne) sont délicatement déposés sur une boîte de pétri contenant un milieu de croissance bactérien riche supplémenté avec l'antibiotique adéquat (dans le cas présent, c'est l'ampicilline qui est utilisée). Chaque clone d'*E. coli* contenu dans la banque est alors répliqué directement sur le filtre de Nylon à l'aide d'un appareil à réplique et les boîtes ainsi préparées sont incubées une nuit à 37°C. Les filtres sont ensuite ôtés de la surface gélosée puis soumis au traitement suivant :

- (1) 2 min sur une solution de dénaturation (NaOH 0,5 M ; NaCl 1,5 M)
- (2) 2 min sur une solution de neutralisation (Tris/HCl pH 7,0 0,5 M ; NaCl 1,5 M)
- (3) 2 min sur une solution de rinçage (tampon 2 x SSC)

Les filtres sont finalement incubés dans une étuve à sec pendant 2 heures à 80°C.

- Préhybridation et hybridation des filtres : la préhybridation est effectuée dans le tampon d'hybridation à 42°C pendant au moins 4 heures. L'hybridation est

accomplie à 42°C une nuit complète en présence de la sonde nucléotidique marquée par le ^{32}P . Le lavage de la membrane s'effectue à 60°C dans la solution de lavage adaptée à la stringence que l'on veut appliquer. Le temps et la fréquence de changement des bains de lavage varient selon la stringence et les niveaux de radioactivité détectés sur la membrane. En général, les bains sont renouvelés toutes les 10 min et le lavage commence avec un tampon de lavage de faible stringence pour terminer par un tampon de plus forte stringence. Un film Kodak X-OMAT AR est finalement exposé aux filtres à -80°C afin de révéler les clones positifs.

Composition des solutions et tampons :

Tampon SSC x 20 : Dissoudre 175,3 g de NaCl et 88,2 g de citrate de sodium dans 800 ml d'eau. Ajuster le pH à 7,0 avec quelques gouttes d'une solution de NaOH 10N. Compléter avec de l'eau jusqu'à 1 litre.

Tampon d'hybridation :

Formamide	50%
Denhardt's	x 5
SDS	0,5%
Tampon Phosphate de Na pH 7,0	50 mM
ADN de sperme de saumon	100 µg/ml
Sérum albumine bovine	0,5%

Réactif de Denhardt's x 100 (quantité pour 500 ml dans l'eau) :

Ficoll 400	10 g
PolyVinylPyrrolidone 40 (PVP40)	10 g
BSA	10 g

Tampon Phosphate pH 7,0 à 1 M (quantité pour 100 ml de tampon) :

Na_2HPO_4	1M	57,7 ml
NaH_2PO_4	1M	42,3 ml

Tampons de lavage :

faible stringence :	SSC x 2 ; SDS 0,2%
stringence moyenne :	SSC x 1 ; SDS 0,5%
forte stringence :	SSC x 0,5 ; SDS 0,5%
	SSC x 0,1 ; SDS 0,5%

- Préparation et marquage d'une sonde nucléotidique au ^{32}P : le fragment servant de sonde nucléotidique est généralement inséré dans le site de clonage multiple d'un plasmide bactérien. Il est donc d'abord nécessaire de le digérer, avec les endonucléases de restriction adéquates puis de séparer le fragment d'intérêt du reste du plasmide par électrophorèse sur gel d'agarose 1% tamponné avec du tampon TAE x 1. La bande correspondant au fragment d'intérêt est ensuite découpée du gel et l'extraction de l'ADN effectuée avec le kit « The GENECLEAN II Kit » commercialisé par BIO 101 Inc. (La Jolla, CA, USA). Le morceau d'agarose est tout d'abord dissout dans une solution d'iodure de sodium 6 M. Lorsque la dissolution est achevée, les molécules d'ADN sont alors captées par une matrice de silice dénommée « Glassmilk ». Les molécules d'ADN en présence de l'agent chaotrope NaI s'adsorbent spécifiquement sur les billes de silice. Après avoir éliminé les sels et l'agarose dissout, les molécules d'ADN sont éluées des billes de silices en présence d'eau stérile.

Le marquage d'une sonde nucléotidique au ^{32}P est menée à bien grâce au kit « Random primed DNA labelling kit » de Boehringer (Mannheim, Allemagne). Le principe est l'amorçage aléatoire de la réaction d'élongation par l'ADN polymérase de Klenow par utilisation d'un mélange d'héxanucléotides représentant toutes les combinaisons de séquences possibles. L'incorporation de l'élément radioactif s'effectue à partir de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (3000 Ci/mmol) dont 50 μCi sont utilisées pour chaque réaction de marquage. La sonde radiomarquée est finalement ajoutée à la solution d'hybridation après dénaturation à 95°C pendant 4 min.

C) Le locus *STA2* chez *C. reinhardtii* représente le gène de structure de la GBSSI

L'analyse qui suit démontre de manière formelle que le gène *STA2* de *C. reinhardtii* correspond au gène de structure de la GBSSI et que le clone CD142 représente un ADNc issu de ce locus. En effet, des analyses de restriction de l'ADN génomique digéré par l'endonucléase BamHI révèlent une modification profonde du profil de restriction dans la souche BAFR1 mutante au locus *STA2* générée par interruption génique (Delrue et coll. 1992). La même modification est aussi observée

dans la souche IJ2 double mutante aux loci *STA2* et *STA3* que Maddelein et coll. (1994) ont généré par croisement de la souche BAFR1 avec une souche mutante *sta3-1*.

De plus, cette modification du profil de restriction dans la descendance méiotique de la souche IJ2 fusionnée à la souche de *C. smithii* « CS9 » a pu être suivie dans le croisement suivant :

	CS9 (<i>C. smithii</i>) +/+	X	IJ2 (<i>C. reinhardtii</i>) <i>sta2-29::ARG7/sta3-1</i>	
		↓		
10		+/+	25%	
	<i>sta2-29::ARG7/sta3-1</i>		25%	descendance
	<i>sta2-29::ARG7/+</i>		25%	méiotique
	<i>+/sta3-1</i>		25%	

352 ségrégeants issus de ce croisement ont été purifiés, amplifiés et leur phénotype d'accumulation d'amidon analysé. 54 recombinants méiotiques ont fait l'objet d'une analyse de restriction dont 21 de génotype *sta2-29::ARG7/+*, 19 de génotype *+/sta3-1* et 14 sauvages. En ce qui concerne les 21 ségrégeants de génotype *sta2-29::ARG7/+* leur profil de restriction, obtenu par digestion avec BamHI et hybridé avec la sonde CD142, présente toujours la même modification que la souche parentale IJ2. On en déduit donc que le gène *STA2* et la sonde CD142 sont très fortement liés génétiquement. Il n'y a maintenant plus de doute quant à la nature du clone CD142 qui représente le gène de structure de la GBSSI (le locus *STA2*).

Protocoles détaillés :

Réalisation des croisements : avant de réaliser la fusion de cellules de polarités sexuelles opposées, il est nécessaire de les mettre dans un état propice à leur fusion. Ainsi les cellules doivent d'abord être différenciées en gamètes avant qu'elles ne soient mises en contact direct. La gamétogenèse est induite chez *Chlamydomonas* en soumettant les cellules à une carence azotée et en présence d'une source lumineuse intense (5000 lux). Pour cela des cellules fraîches cultivées sur milieu gélosé riche (culture de moins de 5 jours) sont mises en suspension dans 2 ml de milieu TAP-N et laissées au minimum 12 heures en lumière forte sans agitation. Avant la mise en contact l'état des cellules est examiné au microscope optique. Après différenciation en gamètes, les cellules sont plus petites et surtout beaucoup plus actives que lors d'une culture non carencée. Des quantités équivalentes de cellules de chaque polarité sexuelle sont mélangées. La fusion est menée toujours en lumière intense. Après une

heure de contact, des fusions cellulaires sont déjà visibles au microscope optique. L'analyse des ségrégeants méiotiques va consister à déposer les produits de la fusion cellulaire sur un milieu riche à 4% agar. Les boîtes ainsi obtenues sont incubées en lumière atténuée pendant 15 heures puis entreposées à l'obscurité totale pendant au moins une semaine. Ceci permet la maturation des zygotes et leur « enkystement » dans l'agar à 4%. Après cette période d'incubation à l'obscurité, les boîtes sont remises à la lumière et les étapes suivantes sont réalisées le plus rapidement possible. Afin d'éliminer le plus grand nombre de cellules végétatives non fusionnées, on gratte très légèrement la surface de la gélose avec une lame de rasoir. Par observation à la loupe binoculaire, une région regroupant une cinquantaine de zygotes est repérée et ceux-ci sont transférés sur une boîte fraîche de milieu riche à 1,5% d'agar. Afin de s'assurer de la disparition complète des cellules végétatives résiduelles la boîte est soumise à des vapeurs de chloroforme pendant 45 secondes à une minute (les zygotes peuvent résister, contrairement aux autres cellules, à ce temps moyen d'exposition aux vapeurs de chloroforme). La présence de lumière va déclencher de façon irréversible l'entrée en méiose des zygotes. Lors de leur germination (facilité par l'humidité plus importante du milieu contenant 1,5% d'agar) les zygotes vont libérer quatre cellules filles haploïdes (une tétrade) qui vont croître par divisions mitotiques et former des colonies sur boîte. L'analyse des produits de méiose peut-être menée de deux manières. La première consiste à étudier de manière aléatoire au moins 200 ségrégeants issus du croisement. Après purification des ségrégeants, les caractères de ces derniers peuvent être étudiés par répliques sur différents milieux sélectifs.

Techniques d'extraction d'ADN génomique : le protocole d'extraction de l'ADN total utilisé est celui décrit par Rochaix et coll. (1991) : en voici le détail :

(1) Centrifuger 10 ml de culture cellulaire à environ $3-5 \times 10^6$ cellules/ml pendant 10 min à 3500 g en falcon de 15 ml.

(2) Le culot de cellules est ensuite resuspendu dans 350 μ l du tampon suivant :

TRIS/HCl pH 8,0	20 mM
EDTA	50 mM
NaCl	100 mM.

(3) Ajouter 50 μ l de protéinase K d'une solution stock à 2 mg/ml (à défaut, on peut utiliser de la pronase à 10 mg/ml).



- (4) Ajouter 25 μ l de SDS à 20 % et incuber 2 heures à 55°C.
- (5) Ajouter 2 μ l de diéthylpyrocarbonate (DEPC) et incuber pendant 15 min à 70°C.
- (6) Refroidir le tube brièvement dans la glace et ajouter 50 μ l d'une solution d'acétate de potassium à 5 M.
- 5 (7) Mélanger en agitant le tube correctement et laisser reposer sur la glace au moins 30 min (il est possible de stopper l'extraction à ce moment là et de la reprendre le lendemain si on laisse les tubes dans la glace en chambre froide).
- (8) Transférer dans un tube « eppendorf » de 1,5 ml et centrifuger 15 min dans une minifuge (à environ 13000 g).
- 10 (9) Récupérer le surnageant en le transférant dans un nouveau tube « eppendorf ».
- (10) Extraire le surnageant par un volume du mélange suivant :
- | | |
|--|--------|
| Phénol (saturé par le TE : Tris/HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM) | 25 vol |
| Chloroforme | 24 vol |
| Alcool isoamylique | 1 vol |
- 15 (11) Après extraction, ajouter 1 ml d'éthanol 100 % à température de la pièce. On doit voir apparaître un précipité sous forme de « cheveux d'ange » si l'extraction est réussie. A partir de ce moment, il faut manipuler avec soin et douceur afin d'éviter que les molécules d'ADN ne se brisent.
- (12) Centrifuger 5 min dans une minifuge (environ 13000 g).
- 20 (13) Rincer le culot avec de l'éthanol à 70 % et centrifuger 3 min en minifuge.
- (14) Recommencer l'opération (13) une ou deux fois afin d'éliminer les sels correctement.
- (15) Sécher le culot en le plaçant 5 min à 37°C, puis le dissoudre dans 50 μ l de TE contenant de la RNase de pancréas de bœuf à 1 μ g/ml.

25 Hybridations moléculaires et analyses par Southern Blot : 25 μ g d'ADN sont digérés totalement avec la ou les endonucléases de restriction adéquates. Les produits de la restriction sont ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose 0,8 %, TBE x 1. Puis le gel est incubé successivement 15 min dans la solution de dépurination et 30 min dans la solution de dénaturation. L'ADN dénaturé est ensuite transféré sur

30 membrane de nylon « Porablot NYplus » (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Allemagne) par capillarité avec le tampon SSC x 20. Après le transfert, la membrane est incubée à 80°C sous vide d'air pendant 2 heures afin de fixer les fragments

d'ADN à la surface de la membrane de nylon. La préhybridation est effectuée dans le tampon d'hybridation à 42°C pendant au moins 4 heures. L'hybridation est accomplie à 42°C une nuit complète en présence de la sonde marquée précédemment préparée. Le lavage de la membrane s'effectue à 60°C dans le tampon de lavage adapté à la stringence que l'on veut appliquer au lavage. Le temps et la fréquence de changement des bains de lavage varient selon la stringence et les niveaux de radioactivité présents sur la membrane. En général, les bains sont renouvelés toutes les 10 min et le lavage commence avec un tampon de lavage de faible stringence pour finir avec un tampon de plus forte stringence. Un film Kodak X-OMAT AR est finalement exposé à la membrane à -80°C afin de révéler les zones d'hybridation.

II) Etude de la liaison de la GBSSI au grain d'amidon.

A) Analyse de l'allèle mutant *sta2-1*

Parmi tous les allèles mutants générés au locus *STA2* chez *C. reinhardtii* un seul conduit à la production d'une GBSSI tronquée de 58 kDa en lieu et place de la protéine sauvage de 76 kDa. C'est le cas de l'allèle *sta2-1* de la souche 18B. Delrue et coll. (1992) par micro-séquençage de la GBSSI extraite d'un gel de polyacrylamide a pu démontrer que les séquences peptidiques amino-terminales des protéines de la souche sauvage (137C) et de la souche mutante (18B) sont identiques.

Séquences amino-terminales :

➤ GBSSI de la souche 137C : ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV

➤ GBSSI de la souche 18B : ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV

La protéine produite par l'allèle mutant *sta2-1* est donc tronquée en position carboxy-terminale et le K_m pour l'ADP-glucose est accrue d'un facteur 6. L'absence de cette séquence carboxy-terminale ne modifie cependant pas les propriétés de fixation de la protéine sur le grain comme le montre la figure 1.

Protocole détaillé :

Technique d'extraction des protéines du grain d'amidon et SDS-PAGE : les protéines sont extraites de 0,3 à 1 mg d'amidon avec 60 µl de tampon d'extraction : β-mercaptoéthanol 5% (v/v) ; SDS 2% (p/v) à 100°C pendant 5 min. Après centrifugation à 13000 g pendant 10 min, le surnageant est récupéré et l'opération est renouvelée une fois avec le culot. Les deux surnageants sont réunis et l'échantillon

peut être chargé dans les puits du gel après avoir rajouté 10 μ l du tampon de chargement suivant : Tris 50 mM, glycine 384 mM, 20% glycérol, SDS 0,1%, bleu de bromophénol 0,001%. La migration est accomplie à température ambiante, à 150 V pendant 1h30 (jusqu'à ce que le bleu de bromophénol quitte le gel). Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie ou par immunodétection (voir plus loin le chapitre spécifique au Western Blot). Lors de la coloration au bleu de Coomassie, le gel est incubé 30 min. dans la solution suivante : 2 g de Coomassie Brilliant Blue R250, 0,5 g de Coomassie Brilliant Blue G250, 425 ml d'éthanol, 50 ml de méthanol, 100 ml d'acide acétique qsp 1000 ml avec de l'eau. Le gel est ensuite décoloré à l'aide des solutions suivantes :

➤ 15 à 30 min dans le décolorant I : 450 ml d'éthanol, 50 ml d'acide acétique, qsp 1000 ml avec de l'eau.

➤ une nuit dans le décolorant II: 80 ml d'acide acétique, 50 ml de méthanol, qsp 1000 ml avec de l'eau ; ce décolorant II permet d'éliminer la coloration non spécifique du gel.

➤ le décolorant III (240 ml d'acide acétique, 200 ml de méthanol, qsp 1000 ml avec de l'eau) permet la décoloration totale du gel si nécessaire.

B) Estimation de la quantité de protéines liées au grain

La quantité de protéines liées au grain d'amidon a été estimée dans différentes conditions de culture et dans des fonds génétiques variables. Pour cela, les cellules ont été placées en conditions d'accumulation massive d'amidon (milieu carencé en azote) ou en conditions de croissance mixotrophe (présence d'azote). Les protéines extraites du grain ont ensuite été déposées sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (présence de SDS). Après la migration, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. Au cours de cette expérience la souche I7 mutante au locus *STAI* a été utilisée. Cette mutation a été décrite en détail par Van den Koornhuysen et coll. (1996) puis par Van de Wal et coll. (1998). Le locus *STAI* correspond au gène de structure de la grande sous-unité régulatrice de l'ADP-glucose pyrophosphorylase. La mutation *stai-1* engendrée lors d'une mutagenèse aux rayons X conduit à l'insensibilité de l'enzyme à l'acide 3-phosphoglycérique, son activateur allostérique. Dès lors, la souche I7 accumule moins de 5% de la quantité normale

d'amidon. L'estimation de la quantité de GBSSI liée au grain est d'environ 0,1% du poids d'amidon en condition de carence azotée pour les souches 137C et 18B. Cette valeur atteint 1% dans les conditions de mixotrophie. Dans le cas de la souche I7, quelque soit les conditions de culture, la GBSSI représente plus de 1% du poids du grain d'amidon. Les techniques employées lors de cette analyse sont les mêmes que celles détaillées au paragraphe précédent.

C) Analyse de la réponse immunitaire en Western Blot

Afin de tester l'antigénicité des antiséra SA137C et SAIJ2 précédemment obtenus chez le lapin, les protéines extraites de 100 μ g d'amidon frais provenant de différentes souches cultivées dans des conditions de culture variables ont été soumises à une analyse par la technique d'immunotransfert (Western Blotting). La réponse immunitaire engendrée vis à vis de la GBSSI lors de l'injection de l'amidon de la souche sauvage (137C) s'avère très spécifique et forte (les protéines étant extraites de seulement 100 μ g d'amidon frais) même dans le cas de la protéine tronquée chez le mutant *sta2-1*. La quantité de protéines liées au grain d'amidon semble plus importante chez le mutant I7 lors d'une culture carencée en azote comme le montre la présence d'une bande de masse supérieure à la GBSSI révélée par l'antisérum SA137C. Ce fait est confirmé par l'analyse en Western blot réalisée avec l'antisérum SAIJ2 où la réponse immunitaire la plus forte est détectée avec les protéines extraites de l'amidon de la souche I7 cultivée en carence azotée.

A des fins de contrôle, nous avons effectué le même type d'expérience en utilisant l'antisérum PA55 obtenu par Abel et coll. (1995). Cet antisérum engendré chez le lapin est dirigé contre un peptide dont la séquence consensus correspond à la région carboxy-terminale fortement conservée dans toutes les amidon-synthétases de plantes supérieures, qu'elles soient solubles ou liées au grain d'amidon. Cet antisérum reconnaît spécifiquement la GBSSI de *C. reinhardtii* lorsqu'elle est présente dans le grain. D'autre part, l'antisérum PA55 reconnaît aussi la protéine tronquée produite par le mutant 18B (*sta2-1*). Il semble donc que la séquence fortement conservée en position carboxy-terminale soit toujours présente dans la protéine tronquée.

Protocoles détaillés :

Technique d'extraction des protéines du grain d'amidon et SDS-PAGE : ces techniques sont les mêmes que celles décrites au paragraphe précédent hormis la coloration au bleu de Coomassie qui est omise dans ce cas.

Technique de transfert et de révélation par les antiséras : lorsque la migration sur SDS-PAGE est terminée, le gel est incubé 30 min dans le tampon « Western » x 1 contenant 20% de méthanol. Les protéines sont ensuite électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose (Protan BA 85 Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) à l'aide d'un appareil d'électrotransfert (Multiphor II, LKB-Pharmacia, Bromma, Suède) à 4°C dans les conditions suivantes: 45 min à 250 mA avec le tampon utilisé précédemment. Après cette étape de transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, cette dernière est incubée 1 heure à température ambiante dans le tampon TBST contenant 3% de BSA. La membrane est ensuite rincée trois fois dans le tampon TBST avant d'être incubée une nuit à 4°C dans l'antisérum primaire de lapin dilué dans le tampon TBS. La membrane est de nouveau rincée trois fois par le tampon TBST puis est incubée une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire biotinylé dilué à 1/500 dans le TBS dirigé contre l'antisérum de lapin. Après trois nouveaux rinçages dans le tampon TBST, la membrane est incubée 30 min à température ambiante avec le complexe streptavidine-phosphatase alcaline dilué à 1/3000 dans le tampon TBS. Finalement, après 3 rinçages dans le tampon TBST, les membranes sont révélées par incubation dans un tampon de diéthanolamine contenant les substrats de la phosphatase alcaline : NBT et BCIP (le temps d'incubation varie selon l'intensité de la réaction). Le kit de détection utilisé est celui proposé par Amersham Buchler (Braunschweig, Allemagne): « Blotting detection kit for rabbit antibodies »

Composition des solutions et tampons :

Tampon « Western » x 10:	Glycine	390 mM
	Tris	480 mM
	SDS	0,375 %
Tampon TBS (Tris Buffer Saline)	Tris/HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	500 mM

Tampon TBST (Tris Buffer Saline Tween): TBS + 0,1% (v/v) Tween 20

NBT: Nitro-Blue Tetrazolium en solution dans le diméthylformamide 70%

BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate en solution dans le diméthylformamide.

III) Ciblage des protéines de fusion dans le grain d'amidon

L'extension carboxy-terminale spécifique de la GBSSI de *C. reinhardtii* n'est pas requise pour le ciblage de la protéine au grain d'amidon *in vivo* comme nous avons pu le démontrer au cours des expériences précédentes. Cette extension d'environ 16 kDa peut être remplacée par une séquence peptidique d'intérêt, autorisant ainsi son ciblage au cœur même du grain d'amidon.

Les différents types de vecteurs susceptibles d'être construits afin d'appliquer cette méthode chez les plantes supérieures, sont constitués :

- d'un gène de sélection et une origine de répllication bactériens afin de pouvoir amplifier le plasmide dans une souche bactérienne appropriée.

- d'un gène de sélection qui permettra une sélection aisée des plantes transformantes

- d'une fusion traductionnelle entre la séquence codante de la GBSSI et une séquence polypeptidique d'intérêt. Deux types de fusions traductionnelles principales peuvent être considérées : dans le premier cas, c'est la séquence tronquée de 58 kDa de la GBSSI qui est fusionnée à la séquence d'intérêt ; dans le deuxième cas, c'est la séquence complète de la GBSSI qui est employée.

- la fusion pourra être placée sous le contrôle d'un promoteur végétal constitutif fort, ou encore d'un promoteur végétal inductible, immédiatement suivi d'un peptide de transit adapté favorisant la translocation de la protéine de fusion vers le chloroplaste.

IV) Protocole de dosage de l'activité amidon-synthétase liée au grain :

20 µg d'amidon sont ajoutés à 100 µl du mélange réactionnel suivant :

Glycylglycine/NaOH pH 9,0	50 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
β-n ercaptoéthanol	5 mM
MgCl ₂	5 mM
Sérum albumine bovine	0,5 mg/ml

ADP-glucose

0,2 mM

[U ¹⁴C]ADP-glucose (235 mCi/mmol

2,66 µg

Citrate trisodique

0 ou 0,5 M (précisé selon

le cas)

5 La réaction est menée à 30°C pendant 15 min. puis arrêtée par addition de 3 ml d'éthanol à 70%. Le précipité obtenu est filtré sous vide sur filtre "Whatman Glass Fiber" (Whatman, Maidstone, Angleterre), rincé par 4 x 5 ml d'éthanol 70%. Le comptage radioactif est réalisé avec un compteur Beckman après avoir introduit les filtres dans des fioles de comptage contenant 3,5 ml de liquide de scintillation.

10 V) méthodes d'extraction et de purification d'amidon sont les suivantes :

- cas d'une algue verte unicellulaire telle que *Chlamydomonas reinhardtii* (voir la méthode décrite ci-dessus)

15 - cas de graines, de tubercules ou tout autre organe de plante supérieure :

l'organe ou le type prélevé sur la plante est correctement homogénéisé (après broyage). Le broyat ainsi obtenu est rincé avec de l'eau au travers d'un tissu filtrant (tel que le Miracloth Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Le filtrat est ensuite laissé au repos pendant deux heures afin de permettre aux grains d'amidon de sédimenter. Le sédiment est rincé une première fois avec plusieurs volumes d'eau puis une deuxième fois avec plusieurs volumes d'une solution de NaCl à 0,1M. Le sédiment est une nouvelle fois filtré puis rincé deux fois avec de l'éthanol avant d'être séché.

20

BIBLIOGRAPHIE

Abel G., Springer F., Willmitzer L. and Kossmann J., (1996), *The Plant Journal*, 10 (6) : 981-991

5

An *et al.* (1986), *Plant Physiol.*, 81, 301-305

Baba T., Nishihara M., Mizuno K., Kawasaki T., Shimada H., Kobayashi E., Ohnishi S., Tanaka K. and Arai Y., (1993), *Plant Physiology*, 103 : 565-573

10

Bevan M. (1984), *Nucleic Acids. Res.*, 12, 8711-8721

Brodelius *et al.* (1979), *FEBS Letters*, 103, 93-97

15

Brodelius (1988), In: Moo-Young M. (Ed), *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamentals and Applications*, Elsevier, Londres

Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S. (1998), *International Journal of Biological Macromolecules*, 23 : 85-112

20

De La Penna *et al.* (1987), *Nature*, 325, 274-276

Delrue B., Fontaine T., Routier F., Decq A., Wieruszeski J-M, van den Koornhuyse N., Maddelein M-L., Fournet B. and Ball S. (1992), *Journal of Bacteriology*, 174 (11) : 3612-3620

25

Deno *et al* (1987), *J. Plant. Physiol.*, 131, 315-322

Denyer K., Clarke B., Hylton C., Tatge H. and Smith A., (1996), *Plant, Cell and Environment*, 18 : 1019-1026

30

Denyer K., Hylton C. and Smith A., (1995), *Planta*, 196 : 256-265

Dry I., Smith A., Edwards A., Battacharyya M., Dunn P. and Martin C. (1992), *The Plant Journal*, 2 (2) : 193-202

5 Edwards A., Marshall J., Sidebottom C., Visser R., Smith A. and Martin C. (1995), *The Plant Journal*, 8 (2) : 283-294

Fontaine T., D'Hulst C., Maddelein M-L, Routier F., Marianne Pépin T., Decq A., Wieruszeski J-M., Delrue B., van den Koornhuyse N., Bossu J-P., Fournet B. and Ball S., (1993), *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (22) : 16223-16230

10 Gao M., Wanat J., Stinard P.S., James M.G., Myers A.M. (1998) *Plant Cell*, 10(3) : 399-412

15 Hovenkamp-Hermelink J., Jacobsen E., Ponstein A., Visser R., Vos-Scheperkeuter G., Bijmolt E., de Vries J., Witholt B. and Feenstra W. (1987), *Theoretical and Applied Genetics*, 75 : 217-221

Jouanin *et al.* (1987), *Plant Sci.*, 53, 53-63

20 MacDonald F. and Preiss J., (1985), *Plant Physiology*, 78 : 849-852

Maddelein M-L., Libessart N., Bellanger F., Delrue B., D'Hulst C., van den Koornhuyse N., Fontaine T., Wieruszeski J-M., Decq A. and Ball S., (1994), *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (40) : 25150-25157

25 Marshall J., Sidebottom C., Debet M., Martin C., Smith A. and Edwards A., (1996), *The Plant Cell*, 8 : 1121-1135

30 Mu C., Harn C., Ko Y-T., Singletary G., Keeling P. and Wasserman B., (1994), *The Plant Journal*, 6 (2) : 151-159

Müller-Röber B., Sonnewald U. and Willmitzer L. (1992), *The EMBO Journal*, 11(4) : 1229-1238

Rochaix J., Mayfield S., Goldschmidt-Clermont M. and Erickson J., (1991), *Plant Molecular Biology : a Practical Approach*, pp 253-275, ed. Shaw C., IRL Press, Oxford

Sanford J.C. (1988), *Trends in Biotechnology*, 6, 299-302

5

Shannon J. and Garwood D. (1984), In *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd ed., Whistler R., Bemiller J., Paschall E., eds., Academic Press, San Diego, California : 26-86

Smith A., (1990), *Planta*, 182 : 599-604

10

Tsai C-Y., (1974), *Biochemical Genetics*, 11 (2) : 83-95

Van den Koornhuyse N., Libessart N., Delrue B., Zabawinski C., Decq A., Iglesias A., Carton A., Preiss J. and Ball S., (1996), *The Journal of Biological Chemistry*, 271(27) : 16281-16287

15

Van de Wal et al (1998), *The Journal of Biological Chemistry*, 273(35) : 22232-22240

Zhang H., Herman P. and Weeks D., (1994), *Plant Molecular Biology*, 24 : 663-672

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend, dans le sens 5'→3', une séquence nucléotidique codant pour une adénosine diphosphate glucose α -1, 4-glucane α -4-glucosyltransférase ou amidon-synthétase EC 2.4.1.21, ou pour une protéine dérivée de cette enzyme, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite enzyme ou protéine dérivée ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique codant pour l'enzyme ou protéine susmentionnée étant placée en amont d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt.

2. Séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée, code pour l'amidon-synthétase liée au grain d'amidon ou GBSS présente notamment chez les plantes, algues ou micro-algues, et plus particulièrement pour l'isoforme GBSSI, ou pour une protéine dérivée de la GBSS telle que définie dans la revendication 1.

3. Séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée, est choisie parmi :

- la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 de l'ADNc codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- ou un fragment de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 représentée, telles que les séquences dont le nucléotide de l'extrémité 5' correspond à celui situé en l'une des positions 1 à 186 de SEQ ID NO : 1, et dont le nucléotide de l'extrémité 3' correspond à celui situé en l'une des positions 1499 à 3117 de SEQ ID NO : 1, notamment :

- la séquence SEQ ID NO : 2 codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de pré-protéine de 708 acides aminés (SEQ ID NO : 3),

. la séquence SEQ ID NO : 4 codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de protéine mature de 651 acides aminés (SEQ ID NO : 5),

. la séquence SEQ ID NO : 6 codant pour un fragment de 438 acides aminés (SEQ ID NO : 7) de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,

. la séquence SEQ ID NO : 8 codant pour un fragment de 531 acides aminés (SEQ ID NO : 9) de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- ou une séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique des séquences nucléotidiques susmentionnées, et codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou pour un fragment peptidique susmentionné de cette dernière,

- ou une séquence nucléotidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment nucléotidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une séquence peptidique dérivée de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou dérivée d'un fragment peptidique susmentionné de cette dernière, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50 %, et de préférence d'au moins environ 70 %, avec la séquence ou fragment nucléotidique susmentionnés,

- ou une séquence nucléotidique susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments nucléotidiques susmentionnés.

4. Séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt est choisie parmi :

- celles codant des peptides biologiquement actifs, notamment des peptides d'intérêt thérapeutique ou utilisables dans le domaine agroalimentaire, ou

- celles codant des enzymes susceptibles de transformer l'amidon, telles que les enzymes interagissant avec les α -glucanes dont les hydrolases diverses, les phosphorylases, les α -1,4 glucanotransférases, les enzymes de branchement, les amylases, et notamment les hydrolases thermostables issues de bactéries extrémophiles telles que les archaebactéries actives à des températures supérieures à 40 °C.



5. Séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique codant un site de clivage, ladite séquence nucléotidique étant placée entre la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, et la séquence nucléotidique codant le polypeptide d'intérêt.

6. Cellules végétales transgéniques, choisies parmi les cellules de plantes, d'algues ou de micro-algues, capables de fabriquer de l'amidon, lesdites cellules comprenant une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 5 intégrée dans son génome ou maintenue de manière stable dans son cytoplasme.

7. Plantes, algues ou micro-algues transgéniques, ou parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, semences, ou fragments de ces plantes, algues ou micro-algues, comprenant une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 5 intégrée dans le génome ou maintenue de manière stable dans le cytoplasme des cellules les composant.

8. Polypeptide de fusion caractérisé en ce qu'il comprend :

- en position N-terminale une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette enzyme, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite amidon-synthétase ou protéine dérivée ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon,

- et, en position C-terminale, un peptide ou polypeptide d'intérêt, la partie C-terminale de la séquence en acides aminés de l'amidon-synthétase, ou de la protéine dérivée, étant ainsi liée à la partie N-terminale de la séquence peptidique d'intérêt, ledit polypeptide de fusion étant codé par une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 5.

9. Polypeptide de fusion selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'amidon-synthétase est choisie parmi :

- la séquence peptidique SEQ ID NO : 3 correspondant à la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de pré-protéine de 708 acides aminés;

- ou un fragment de la séquence peptidique SEQ ID NO : 3, telles que les séquences dont l'acide aminé de l'extrémité aminoterminal correspond à celui situé en l'une des positions 1 à 58 de SEQ ID NO : 3, et dont l'acide aminé de l'extrémité carboxyterminale correspond à celui situé en l'une des positions 495 à 708 de SEQ ID NO : 3, notamment :

. la séquence SEQ ID NO : 5 correspondant à la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* sous forme de protéine mature de 651 acides aminés,

. la séquence SEQ ID NO : 7 correspondant à un fragment de 438 acides aminés de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,

. la séquence SEQ ID NO : 9 correspondant à un fragment de 531 acides aminés de la séquence peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- ou une séquence peptidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment peptidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence peptidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avantageusement d'au moins environ 80%, avec la séquence ou fragment peptidique susmentionnés.

10. Polypeptide de fusion selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend un site de clivage placé entre d'une part l'amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, et, d'autre part, le polypeptide d'intérêt.

11. Grains d'amidon caractérisés en ce qu'ils comprennent un ou plusieurs polypeptides de fusion définis dans l'une des revendications 8 à 10.

12. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des grains d'amidon selon la revendication 11, le cas échéant en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, lesdits grains contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis dans l'une des revendications 8 à 10, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion possédant un effet thérapeutique déterminé.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme administrable par voie parentérale, notamment par voie intraveineuse, ou sous une forme administrable par voie orale, le diamètre des grains d'amidon étant compris entre environ 0,1 μm et quelques dizaines de μm , et la proportion en poids des polypeptides de fusion dans ces grains étant comprise entre environ 0,1 % et 1 %.

14. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis dans l'une des revendications 8 à 10, le cas échéant en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion possédant un effet thérapeutique déterminé.

15. Composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend des grains d'amidon selon la revendication 11, lesdits grains contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis dans l'une des revendications 8 à 10, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion étant utilisable dans le domaine agroalimentaire.

16. Procédé de préparation de grains d'amidon selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- transformation de cellules végétales, à l'aide d'un hôte cellulaire, tel que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur recombinant, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, contenant une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 5,

- obtention de plantes, algues ou micro-algues transformées de manière à ce que leur génome contienne une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 5, par culture *in vitro* des cellules hôtes transformées susmentionnées,

- le cas échéant, fécondation et récupération des semences des plantes obtenues à l'étape précédente, et mise en culture de ces semences pour l'obtention de plantes de génération suivante,

- extraction des grains d'amidon à partir des plantes, algues ou micro-algues, ou de parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou de fragments de ces plantes, algues ou micro-algues transformées susmentionnées, notamment par sédimentation.

17. Procédé de préparation de polypeptides de fusion selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 16, ledit procédé comprenant une étape supplémentaire de récupération, et le cas échéant de purification, des polypeptides de fusion à partir des grains d'amidon.

18. Procédé de préparation d'un peptide d'intérêt caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 16 ou la revendication 17, ledit procédé étant effectué par transformation des cellules hôtes avec des séquences nucléotidiques selon la revendication 5, et comprend une étape supplémentaire de clivage du polypeptide de fusion obtenu, à l'aide d'un réactif approprié, puis, le cas échéant, une étape de purification du polypeptide d'intérêt.

19. Procédé de biotransformation de grains d'amidon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- transformation de cellules végétales, à l'aide d'un hôte cellulaire, tel que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur recombinant, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, contenant une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 4, codant des enzymes susceptibles de transformer l'amidon,

- obtention de plantes, algues ou micro-algues transformées de manière à ce que leur génome contienne une ou plusieurs séquences nucléotidiques susmentionnées, par culture *in vitro* des cellules hôtes transformées susmentionnées,

- le cas échéant, fécondation et récupération des semences des plantes obtenues à l'étape précédente, et mise en culture de ces semences pour l'obtention de plantes de génération suivante,

5 - extraction des grains d'amidon à partir des plantes, algues ou micro-algues, ou de parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou de fragments de ces plantes, algues ou micro-algues transformées susmentionnées, notamment par sédimentation,

- le cas échéant, chauffage desdits grains d'amidon à une température à laquelle le peptide d'intérêt du polypeptide de fusion est susceptible d'être actif.

Figure 1

ATTGGGACGAGTGACCGCATGCACTACGGTACCGTGCCCGGTGGTAGCCTCCACGGCGGCGCTGGTCGACACCGTCAAGGAGGGCGGTCAACGGGCTTCCA
TAAGCCGTGCTACGTCGGGTACGTGATGCCATGGCACGGGCACCATCGGAGGTGGCCGCGGACCAAGTGTGGCAGTTCTCTCCGCAAGTGGCCGAAGGT
S A R V H A M H Y G T V P V A S T G G L V D T V K E G V T G F H
CATGGGCGCCCTGAACCCGACAAAGCTGGACAGAGGTACGCCAGCCCTGGCCGCCACCGTGGCGCGGTGTTTGGGGGGGGCGGCTAC
GTACCCGCGGGACTTGGGGCTGTTCCGACTGCTCCGACTGCGGCTGGGACCGCGGTGGCAGCGGCACGGTGGTCCACAAACGCCCGCGCGGCGATG
M G A L N P D K L D E A D A L A A T V R R A S E V F A G G R Y
CCCGAGATGGTGGCCCAACTGCATCAGCCAGGACCTGTCTGTGTCACAGCCCGCCAGAGTGGAGGGCCCTGCTGGAGGAGTGGTGTACGGCAAGGGCG
GGGCTCTACCAACCGGTTGACGTAGTCGGTCTTGACAGGACCAAGTTGGGGGGGTCTTCACTCCCGGACGACCTCTCCACACATGCCGTTCCCGC
P E M V A N C I S Q D L S W S K P A Q K W E G L L E E V Y G K G G
GCGTGGCCACCGCCAAAGAGGAGAGATCAAGGTGCCCCGTGCGGAGAAAGATCCCGGGCGACCTGCCCGCGGTGTCTACGCCCCCAACACCCCTGAAGCC
CGCACCGGTGGCGGTCTCTCTCTAGTTCCACGGGCAACGGCTCTTAGGGGCGCGTGGACGGCGGCGCACAGGATCGGGGGTGTGGGACTTCGG
V A T A K K E E I K V P V A E K I P G D L P A V S Y A P N T L K P
CGTGTCCGCTCCGTGGAGGCAACGGCGCGCGCCGCGCCAAAGGTGGCACCACCGCCCGCCCATGGCGCGGTGGCGCGGACACCCCTCGGGCCCC
GCACAGCGGAGCACCTCCGTTGCCGCGGCGGCGGGTTCAGCCGTGGTGGCGGGCGGTACCCGCGCACCGCGCGCTGGTGGGGAGCCCGGGG
V S A S V E G N G A A A P K V G T T A P A M G A W R A T T P S G P
TCGCCCGCGCCGCCAACCCCAAGTGACCACTACAAGCCCGCTGCCCGCACCGCCAAAGCCAGCCGCTGGCTCAAGTGGCGGTGAGGCCT
AGCGGCGGCGGCGGTGGGGTTCCTACTGTGGATGTTCCGCGGCGGACGGCGGTTCGGGTTCTGGCGACCGGAGTTCGACCGGCCACTCCGGA
S P A A A T P K V T Y K P A L P A T A K P K T A G L K L A G E A S
CCACCACTCGGACCTCGGAGAACGGCGCTGCCCTCCAAAGGCAACGGCAACGGTGCCTCGGCCCTCCAGACCTCGGCTGCCAAGCCCTGGTCTCCGCGCG
GGTGGTGGAGCTGGAGCCTCTTGCCGCGGACGGAGGTGCCGTTGCCAGGACCGGAGGTCTGGAGCCGACGGTTCGGGGACCAAGAGCGGCGG
T T S T S E N G A A S N G N G A S A S K T S A A K P L V S A A
CACCCGCAAGTCCGCCCTAAAGCGGCAGTAGCCGCGCAGAGGGCGGACAGCATGAGCGGCTCGACCAAGCTGTGGCAGGAACGGCTGTAGCAGCGGACGGC
GTGGCGTTTCAGGCGGATTTGCGCGTTCATCGGCGTCTCGCGCGCTGTCTGCTACTCGCCGAGCTGGTTTCGACACCGCTCTTGGCGACATCGTCCGCGCTCCG
T R K S A
GGCCGCCACCGCGGAGGACAGGCTTGCGGACGCGAGGGCGATGAGCTTAGCGGCGGTGAGCATGGCAGCGGGAACGCTGTGTACTGAAATGTGGTGCAT
CCGCGGTGGCGGCTCCTCGTCCGAACGCCGCTCGCTCCCGCTACTCGAATCGCCGCGCACTCGTACCGTCCGCGCTTTCACACATGACTTACACACCGTA
GAGAGTGTGCTGTAATGAAGTCGGTTTTCGAGACCGGAGAAACGCCGGTTTGGTTTTGTAGTGCAGGGCCCTGTGGTTTCGGTTTTTGCCCAAGTCCA
CTCTCACAGCAGACATTACTTCAGCCAAACGCTCTGGCCTCTTTGGGCGCAAAACCAAAACATACGTCCCGGACACCAAGCCAAACCGGTTTCAGGT

Figure 1 (suite 1)

AAAGAAGAGTAAACGAAACTGTAGCAGTAGCAGAGCAGTTCGCGGGCGGGAGACACGCGGCGCGTGCAGCCCTGTCCCTGCCCTCAGCCCTTGTGATTC
TTTCTTCTCATTTGACATCGTCTCATCGTCTCGTGAACGCGCGCGCGCTGCTGCGCGCGGACCGCTCGGACAGGACGGGAGTCCGAAACACTAAG
GGCGGCAAGAGGGGGGTCTGTACACTCCATCCATCCAGGATTTTTCAGGCTGCCCTGAGAGTTTGCCATTTTGTGGACGTGAGCGGCGGGACGGCCG
CCGCCGTTCTCCCGCCAGACATGTGAGGTAGGTAAAGTCCATAAAACGTCGACGGACTCTCAAAACGGTAAACACCCCTGCACCTCGCCGCCCTGCCGGC
CGCCGGGCTCTCCTACCGCCTCCGGCAACGGAGAAAGTGGAGGGCTGTAGCCCGGTGACCCCCCAATGTAGAGGATGGGATACATAAGAGCGTGTGGAA
GGCGCCCGAGAGGATGGCGAGGCCGTTGCCCTCTTACCCCTCCGCGACATCGGGCCACTGGGGGTTACATCTCTACCCCTATGTATTTCTCGCACACCTT
TGGTGGTAAAGAGAGGGGGCTGGGTCCGCCCTCGATGGTTTGTGAGGTGCAGACGGCACCGTCCGGCTCAAAGGCCCTCGCAAGGCCCGGGTGCCT
ACCACCATTTTCTCCTCCCGGACCCAGCGGGGAGCTACCAAAACAACCTCCACGTCTGCCGTGGCAGCCGAGTTTCCGGGAGCGTTCCGGGGCCCCACGGA
TGGGCTCATTTTGGTGCCCGTCGATGATGAGAGATTGGCCAGCGGTTTTTTGAGGCTGGCTCGAAGCGAGGGTTTGTGGAAGTGGAGCGGAGGGTTG
ACCCGAGTAAAAACACGGGCAGCTACTCTCTAACC GGTCGCCAAAAAACCTCCGACCGAGCTTCGCTCCCAAACACCTTCACCTCGCTCCTCCCCAAC
GAGAAAGAGGGCGGACATGCTTGACTGGAGGTACACAAAGTGGAGCGTCCGACGGCACGGAGGCAATTGGCGGACTATTGACCCAGTAGTGTGGAAGTAGT
CTCTTCTCCGCCCTGTACGAACTGACCTCCATGTGTTTACCTCGCACGCTGCCGTGCCCTCCGTAACCGCCTGATAACTGGGTCAACACCTTTCATCA
TGGACCTGAATTTTGTAGAGTACCGCGCATTAATCCGTGAGAGAGTAACAAAGATGGCACCTGAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
ACCTGGACTTAAGAAACTCTCATGGCGGTAATTAGGCACCTCTCTCATTTGTTCTACCGTGGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Figure 2

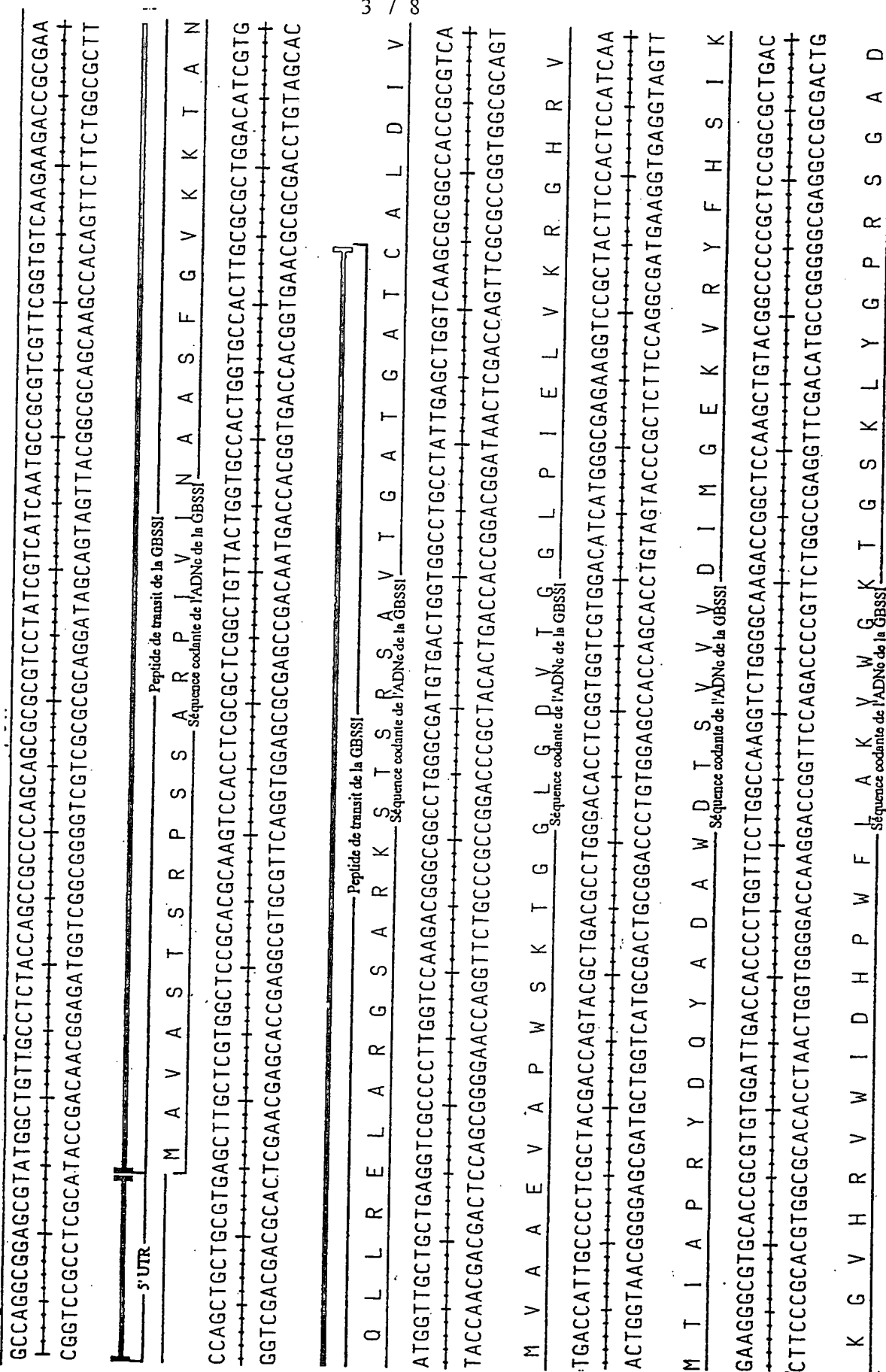


Figure 2 (suite 1)

TACCTGGACAACCAAGCGCTTCGCCCTGTTCTGCAAGCGCGCTATTGAGGCTGCCCGCTGCTGCCCTTCGGCCCGGCGAGGACTGGCTCTTCGIGG
 ATGGACCTGTTGGTGTTCGGAAGCGGACAAAGACGTTCCGGCGATAACTCCGACGGGCGCACGACGGGAAGCCGGGGCCGCTCTCTGACGCAGAAGCACC
 Y L D N H K R F A L F C K A A E A A R V L P F G P G E D C V F V
 CCAACGACTGGCACTCCGCCCTGGTCCCGCTCTGCTGAAGGACGAGTACCAGCCCAAGGGCCAGTTCACCAAGGCCAAGTCGGTGCIGGCTATCCACAA
 GGTGCTGACCGTGAGGCGGGACCAACGGCAGGACGACTTCCTGCTCATGTTCCGGTCAAGTGGTTCGGTTCAGCCACGACCGCATAGGTGTT
 A N D W H S A L V P V L L K D E Y Q P K G O F T K A K S V L A I H N
 CATCGCCTTCCAGGGCGCATGTGGGAGGAGGCTTTCAGGACACGAAGCTGCCCGCAGGCGCCTTTGACAAGCTGGCCTTCTCGGACGGCTATGCCAAG
 GTAGCGGAAGTCCGGCGTACACCTCCTCCGAAAGTTCCTGTGCTTCGACGGGGTCCGGCGGAACTGTTGACCGGAAGAGCCTGCGCATACGGTTC
 I A F Q G R M W E E A F K D T K P Q A A F D K L A F S D G Y A K
 GTTACACTGAGGCCACCCCATGGAGGAGGACGAGAAGCCCGCTGACGGGAAGACCTACAAGAAGATCAACTGGCTGAAGGGTGGCATTATCGCCG
 CAAATGTGACTCCGGTGGGGTACCCTCCTCTGCTCTTCGGGGCGGACTGCCCTTCTGGATGTTCTTAGTTGACCGACTTCCCACCGTAATAGCGGC
 V Y T E A T P M E E D E K P P L T G K T Y K K I N W L K G G I I A
 CCGACAAGCTGGTGACTGTGCGCCCAACTACGGACCGAGATCGCTGCGCATGCCCGCGGGGTGGAGCTGGACACCGTCAATCCGCGCCCAAGGGCAT
 GGCTGTTGACCACTGACACAGCGGGTTGATGCGCTGGCTCTAGCGACGGCTACGGCGGGCGCCACACCTCGACCTGTGGCAGTAGGCGCGGTTCGCCGTA
 A D K L V T V S P N Y A T E I A A D A A G G V E L D T V I R A K G I
 TGAGGGCATTGTGAACGGCATGGACATTGAGGAGTGAACCCCAAGACCGACAAGTTCCTGCTGCGCCCTACGACCAGAACAGCGTCTACGCGGCAAG
 ACTCCCGTAACACTTCCCGTACCTGTAACTCCACCTTGGGTTCTGGCTGTTCAAGGACAGACGGGGATGCTGGTCTTGTGCGCAGATGCGGCGGCTTC
 E G I V N G M D I E E W N P K T D K F L S A P Y D Q N S V Y A G K



Figure 2 (suite 2)

[illegible]

A A A K E A L Q A E L G L P V D P T A P L L F A F I G R L E E Q K G
 Séquence codante de l'ADNc de la GBSSI

TGGACATCATCTGGCCGCCCTGCCCAAGATCTTGGCCACCCCAAGGTGCAGATCGCCATCTTGGGTACCGGCAAGGCCCTACGAGAAGCTGGTGAA
ACCTGTAGTAGGACCGCGGACGGGTCTAGGACCGGTGGGGGTTCACAGTCTAGCGGTAGGACCCCATGGCCGTTCGGCGGATGCTCTTCGACCACCTT

V D I I L A A L P K I L A T P K V Q I A I L G T G K A A Y E K L V N

Séquence codante de l'ADNc de la GSSI

CGCCATCGGCACCAAGTACAAGGGCCGCGCCAAGGGCGTGGTCAAGTTCTCGGCGCCCTGGCGCACATGCTCACCGGCGCGGCTCATGCTGGTG
GCGGTAGCCGTGGTTCATGTTCCCGGCGCGGTCCCGCACCAAGTCAAGAGCCGGGGACCGCGGTACGAGTGGCGGCGCGGCTGAAGTACGACCAC

A I G T K Y K G R A K G V V K F S A P L A H M L T A G A D F M L V
 Séquence codante de l'ADNc de la GBSS1

CCCCTCGCGCTTCGAGCCCTGCGGCTGATCCAGCTGCACGCCATGCACCTACGGTACCGTGCCCGTGGTAGCTCCACCGCGGCCCTGGTCGACACCGTCA
GGGAGCGCGAAGCTCGGGACGCCGGACTAGGTCGACGTGCGGTACGTGATGCCATGGCACGGGCACCATCGGÁGGTGGCCGCCCGGACCAGCTGTGGCAGT

P S R F E P C G L I Q L H A M H Y G T V P V V A S T G G L V D T V

Séquence codante de l'ADNc de la GESS1

AGGAGGGCGTCACCGGCTTCCACATGGGGCGCCCTGAACCCGACAGCTGGACGAGGCTGACGCCGACGCCCTGGCCGCCCTGCCACGCCG
TCTCCCGCAGTGGCCGAAGGTATACCCGCGGGACTTGGGGCTGTTGACCTGCTCCGACTGCGGCTGCGGGACCGGGCGGTGGCACGCGGCACGGTCGCT

K E G V T G F H M G A L L N P D K L D E A D A D A L A A T V R R A S E
 Séquence codante de l'ADNo de la CBSS1

GGTGTTCGGGGCGCGCTACCCCGAGATGGTGCCAACTGCATCAGCCAGGACCTGTCTGGTCCAAGCCCGCCAGAGTGGGAGGGCCTGCTGGAG
CCACAAACGCCCGCGCGGCGATGGGGCTCTACCAACCGGTGACGTAGTCGGTCTTGGACAGGACCAGGTTCTGGGGGGGTCTTCACCCCTCCCGGACGACCTC

V F A G G R Y P E M V A N C I S Q D L S W S K P A Q K W E G L L E

Figure 2 (suite 3)

GAGGTGGTGTACGGCAAGGGGGGGTGGCCACCGCCCAAGAGGAGAGATCAAGGTGCCCGTTGCCGAGAAGATCCCCGGGACCTGCCCGCGTGTCTCTCCACCATGCGGTTCCCGCGCACCGGTGGCGGTTCTCTCTCTAGTTCACGGGCAACGGCTCTTCTAGGGCCGCTGGACGGGGGGCACAGGA

E V V Y G K G G V A T A K K E E I K V P V A E K I P G D L P A V S

----- Séquence codante de l'ADNc de la GBSSI -----

ACGCCCCAACACCCCTGAAGCCCGTGTCCGCCCTCCGTGGAGGGCAACGGGCGCGCGCCCAAGTTCGGCACCAACCGCCCCCGCCCATGGGGCGGTGGC

TGGGGGGTGTGGGACTTCGGGCACAGGGGAGGCACCTCCCGTTGCCGCGGGCGGGTTCAGCCGTGGTGGCGGGGGCGGTACCCCGCGCACCGC

Y A P N T L K P V S A S V E G N G A A P K V G T T A P A M G A W R

----- Séquence codante de l'ADNc de la GBSSI -----

CGGACCAACCCCTCGCCCGCGCGCCACCCCAAGGTGACCACTACAAGCCCGCCTGCCCGCACCGCCCAAGCCCAAGACCGCTGGC

GCGTGGTGGGGAGCCCGGGAGCGGGCGGGTTCACCTGGTGGATGTTCCGGCGGGACGGCGGTGGCGGTTCTGGCGACCG

A T T P S G P S P A A A T P K V T T Y K P A L P A T A K P K T A G

----- Séquence codante de l'ADNc de la GBSSI -----

CTAAGCTGGCCGGTGAGGCCTCCACCACTCGACCTCGGAGAACGGCGTGCCTCCAAACGGCAACGGTGCCTCGGCCTCCAAGACCTCGGCTG

GAGTTCGACCGGCCACTCCGGAGGTGGTGGAGCTGGAGCCTCTTCCCGCGACGGAGGTTCGGTTCGCCACGGAGCCGGAGGTTCTGGAGCCGAC

L K L A G E A S T T S T S E N G A A S N G N G A S A S K T S A

----- Séquence codante de l'ADNc de la GBSSI -----

CAAAGCCCTGGTCTCCGCGCCACCCGCAAGTCCGCCTAAGCGGCAGTAGCCGCAGAGGGCGGACAGCATGAGCGGCTCGACCAAAGCTGTGGCAGG

GGTTCGGGGACCAAGGGCGGGTGGCGGTTACGGCGGATTCGCCGTCTATCGGCGTCTCCGCGCTGTCGTACTCGCCGAGCTGGTTTCGACACCGTCC

A K P L V S A A T R K S A

----- Séquence codante de l'ADNc de la GBSSI -----

AACGGCTGTAGCAGGGCAGGGCGCCGCCACCGCGGAGGAGCAGGCTTGGGGCAGCGAGGGCGCATGAGCTTAGCGGCCGTGAGCATGGCAGGGCGGAACG

TTGCCGACATCGTCCCGTCCGCGGGGTGGCCGCTCCTCGTCCGAACGGCGTCCGCTACTCGAATCGCCGGGACCTCGTACCGTCCGCTTTGC

----- Séq non codante de l'ADNc de la GBSSI -----

Figure 2 (suite 4)

TGTGTACTGAAATGTGGTGCATGAGAGTGTCTGTCTGTAATGAAGTCGGTTTTGCGAGACCGGAGAAACGCCGTTTGGTTTTGTAGTGCAGGGCCTGTG
ACACATGACTTTACACCACGTACTCTCACAGCAGACATTACTTCAGCCAAAACGCCTCTGGCCTCTTTGCGGCCAAACCAACATCACGTCCCGGACAC

----- Séq non codante de l'ADNc de la GBSSI -----

GTTTCGGTTTTGCCCAAGTCCAAAAGAAGAGTAACGAAACTGTAGCAGTAGCAGAGCACTTGCGGGCGGCGGACCAACGCCGCCGTGCGCAGCCTGT
CAAAGCCAAAACGGGTTTCAGGTTTCTCTCATTTGCTTTGACATCGTCATCGTGAACGCGCCGCCGCTGGTGGGCCGGGCACGCGTCCGGACA

----- Séq non codante de l'ADNc de la GBSSI -----

CCTGCCCTCAGCCTTGTGATTCGGGGCAAGAGGGGGTCTGTACACTCCATCCATCCAGGATTTTGCAGGCTGCCTGAGAGTTTGCCATTTTGTGG
GGACGGGAGTCGGAACACTAAGCCGCCGTCTCCGCCCAGACATGTGAGGTAGGTAAAGTCTCTAAAACGTCCGACGGACTCTCAAACGGTAAACACACC

----- Séq non codante de l'ADNc de la GBSSI -----

GACGTAGCGGGCGGACGGCGCGCGGGCTCTCTACCGCTCCGGCAACGGAGAAGTGGGAGGCGCTGTAGCCCGGTGACCCCCCAATGTAGAGGATG
CTGCACTCGCCGCCCTGCCGGCGCGGGCCGAGAGGATGGCGGAGGCGGTTGCCCTCACCCCTCCGCGACATCGGGCCACTGGGGGGTTACATCTCCTAC

----- Séq non codante de l'ADNc de la GBSSI -----

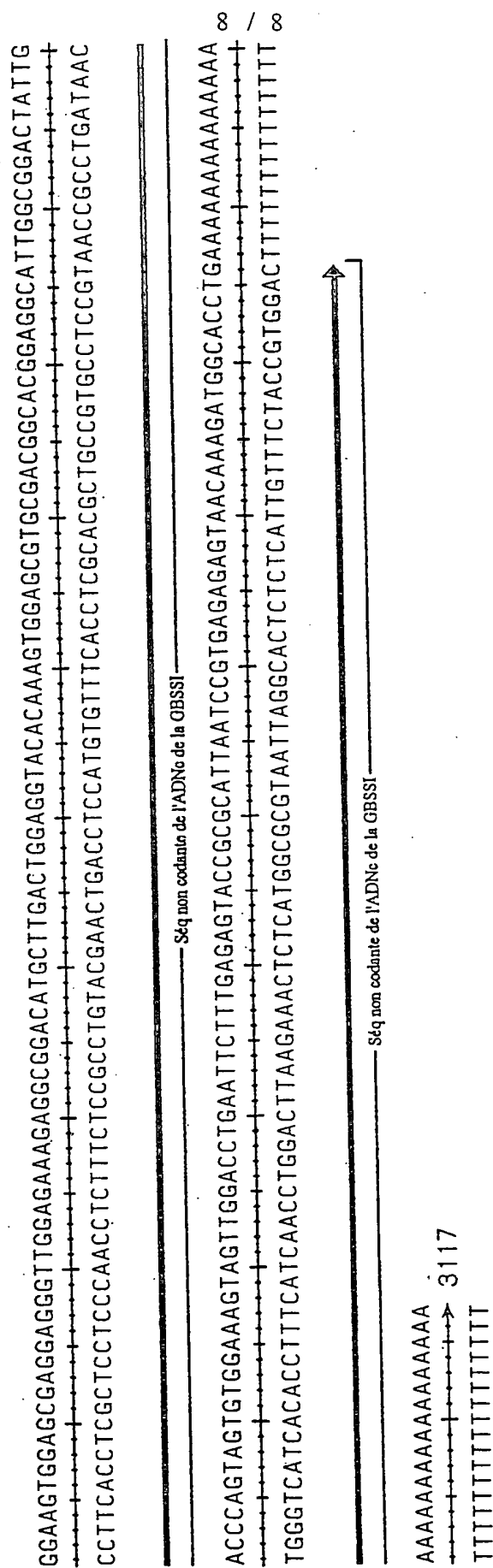
GGATACATAAGAGCGTGTGGAAATGGTGGTAAAGAGGAGGGGCTGGGTGCGCCCCCTCGATGGTTTTGTAGGTGCAGACGGCACCGTCGGCGTCAAAGG
CCTATGTATTCTGCACACCTTACCACCATTTCTCTCCCGGACCCAGCGGGGAGCTACCAAAACAACCTCCACGCTGCGGTGGCAGCCGCAGTTCC

----- Séq non codante de l'ADNc de la GBSSI -----

CCCTCGCAAGGCCCGGTGCCCTTGGGCTCATTTTGGTGCCCGTCCGATGATGAGAGATTGGCCAGCGGTTTTTTGAGGCTGGCTCGAAGCGAGGGTTGT
GGGAGCGTTCCGGGCCACGGAACCCGAGTAAAAACCACGGGCAGCTACTACTCTCTAACCGGTCCGCCAAAACCTCCGACCGAGCTTCGCTCCCCAAACA

----- Séq non codante de l'ADNc de la GBSSI -----

Figure 2 (suite 5)



LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS

<120> GRAINS D'AMIDON CONTENANT UN POLYPEPTIDE RECOMBINANT
D'INTERET, LEUR PROCEDE D'OBTENTION, ET LEURS
UTILISATIONS

<130> WOB 99AB CNR AMYL

<140>

<141>

<150> FR9906494

<151> 1999-05-21

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3117

<212> ADN

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 1

```
gccaggcgga gcgtatggct gttgcctcta ccagccgccc cagcagcgcg cgtcctatcg 60
tcatcaatgc cgcgtcgttc ggtgtcaaga agaccgcgaa ccagctgctg cgtgagcttg 120
ctcgtggctc cgcacgcaag tccacctcgc gctcggctgt tactgggtgcc actgggtgcca 180
cttgccgcgt ggacatcgtg atggttgctg ctgaggtcgc cccttggtcc aagacgggcg 240
gcctggggcga tgtgactggt ggcctgccta ttgagctggt caagcgcggc caccgcgtca 300
tgaccattgc ccctcgctac gaccagtacg ctgacgcctg ggacacctcg gtggtcgtgg 360
acatcatggg cgagaaggtc cgctacttcc actccatcaa gaaggcggtg caccgcgtgt 420
ggattgacca cccctgggtc ctggccaagg tctggggcaa gaccggctcc aagctgtacg 480
gcccccgctc cggcgctgac tacctggaca accacaagcg cttcgcccgt ttctgcaagg 540
ccgctattga ggctgccccg gtgctgccct tcggcccccg cgaggactgc gtcttcgttg 600
ccaacgactg gcactccgcc ctgggtgccg tcctgctgaa ggacgagtac cagcccaagg 660
gccagttcac caaggccaag tcgggtgctg ctatccacaa catcgccctc cagggccgca 720
tgtgggagga ggctttcaag gacacgaagc tgccccaggc cgcctttgac aagctggcct 780
tctcggacgg ctatgccaag gtttacactg aggccacccc catggaggag gacgagaagc 840
ccccgctgac gggaaagacc tacaagaaga tcaactggct gaagggtggc attatcgccg 900
ccgacaagct ggtgactgtg tcgcccact acgcgaccga gatcgctgcc gatgccgcg 960
gcggtgtgga gctggacacc gtcatccgcg ccaagggcat tgagggcatt gtgaacggca 1020
tggacattga ggagtggaa cccaagaccg acaagttcct gtctgcgccc tacgaccaga 1080
acagcgtcta cgcgggcaag gccgcgcgca aggaggccct gcaggccgag ctgggcctgc 1140
ctgtggaccc caccgcccc ctgttcgccc tcctcgcccg cctggaggag cagaagggtg 1200
tggacatcat cctggccgcc ctgcccaga tcctggccac cccaagggtg cagatcgcca 1260
tcctgggtac cggcaaggcc gcctacgaga agctggtgaa cgccatcgcc accaagtaca 1320
agggccgcgc caaggcgctg gtcaagttct cggcgcccct ggcgcacatg ctaccgcgcg 1380
gcgccgactt catgctggtg ccctcgcgct tcgagccctg cggcctgatc cagctgcacg 1440
ccatgcacta cggtagcgtg cccgtggtag cctccaccgg cggcctggtc gacaccgtca 1500
aggaggcggt caccggcttc cacatgggcg ccctgaaccc cgacaaagctg gacgaggctg 1560
acgcccgcgc cctggccgcc accgtgcgcc gtgccagcga ggtgtttgcg ggcggccgct 1620
accccagat ggtggccaac tgcatcagcc agcacctgtc ctggtccaag cccgcccaga 1680
agtgggaggg cctgctggag gaggtggtgt acggcaaggg cggcgtggcc accgccaaga 1740
aggaggagat caaggtgccc gttgccgaga agatccccgg cgacctgccc gccgtgtcct 1800
acgcccccaa caccctgaag cccgtgtccg cctccgtgga gggcaacggc gccgcgcgcg 1860
ccaaggtcgg caccaccgcc cccgccatgg gcgcgtggcg cgcgaccacc cctcggggcc 1920
cctcgccgcg cgccgccacc cccaaggtga ccacctaaa gcccgccttg cccgccaccg 1980
ccaagcccaa gaccgtggc ctcaagctgg ccggtgaggg ctcaccacc tcgacctcgg 2040
agaacggcgc tgcctccaac ggcaacggca acggtgcctc ggccccaag acctcggtg 2100
```

```

ccaagcccct ggtctccgcc gccacccgca agtccgccta aagcggcagt agccgcagag 2160
gcgggcgacag catgagcggc tcgaccaaag ctgtggcagg aacggctgta gcagcggcag 2220
gcgggccgcca ccggcgagga gcaggcttgc ggcagcgagg gcgatgagct tagcggccgt 2280
gagcatggca ggcggaacg tgtgtactga aatgtggtgc atgagagtgt cgtgctgtaa 2340
tgaagtcggg tttgcgagac cggagaaacg ccggtttggt tttgtagtgc agggcctgtg 2400
gtttcggttt tgcccaagtc caaaagaaga gtaacgaaac tgtagcagta gcagagcact 2460
tgcgcgggcg ggcgaccacg ccggcccgtg cgcagcctgt cctgccctca gccttgtgat 2520
tcggcgggcaa gagggcgggt ctgtacactc catccattcc aggatttttg caggctgcct 2580
gagagtttgc cattttgtgg gacgtgagcg gcgggacggc cgcgcggggc tctcctaccg 2640
cctccggcaa cggagaagtg ggaggcgctg tagcccgtg acccccaat gtagaggatg 2700
ggatacataa gagcgtgtgg aatggtggtg aaagaggagg ggcctgggtc gcccctcgat 2760
ggttttgttg aggtgcagac ggaccgctc gcgtcaaagg ccctcgcaag gcccggtgc 2820
cttgggctca tttttggtgc ccgtcgatga tgagagattg gccagcggtt ttttgaggct 2880
ggctcgaagc gagggtttgt ggaagtggag cgaggagggt tggagaaaga ggcgacatg 2940
cttgactgga ggtacacaaa gtggagcgtg cgacggcacg gaggcatttg cgactattg 3000
accagtagt gtgaaagta gttggacctg aattctttga gagtaccgcg cattaatccg 3060
tgagagagta acaaagatgg cacctgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 3117

```

<210> 2

<211> 2124

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence complète de l'ADNc codant la GBSSI
de Chlamydomonas reinhardtii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2124)

<400> 2

```

atg gct gtt gcc tct acc agc cgc ccc agc agc gcg cgt cct atc gtc 48
Met Ala Val Ala Ser Thr Ser Arg Pro Ser Ser Ala Arg Pro Ile Val
1 5 10 15

atc aat gcc gcg tcg ttc ggt gtc aag aag acc gcg aac cag ctg ctg 96
Ile Asn Ala Ala Ser Phe Gly Val Lys Lys Thr Ala Asn Gln Leu Leu
20 25 30

cgt gag ctt gct cgt ggc tcc gca cgc aag tcc acc tcg cgc tcg gct 144
Arg Glu Leu Ala Arg Gly Ser Ala Arg Lys Ser Thr Ser Arg Ser Ala
35 40 45

gtt act ggt gcc act ggt gcc act tgc gcg ctg gac atc gtg atg gtt 192
Val Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Cys Ala Leu Asp Ile Val Met Val
50 55 60

gct gct gag gtc gcc cct tgg tcc aag acg ggc ggc ctg ggc gat gtg 240
Ala Ala Glu Val Ala Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val
65 70 75 80

act ggt ggc ctg cct att gag ctg gtc aag cgc ggc cac cgc gtc atg 288
Thr Gly Gly Leu Pro Ile Glu Leu Val Lys Arg Gly His Arg Val Met
85 90 95

acc att gcc cct cgc tac gac cag tac gct gac gcc tgg gac acc tcg 336
Thr Ile Ala Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Ala Asp Ala Trp Asp Thr Ser
100 105 110

```

gtg gtc gtg gac atc atg ggc gag aag gtc cgc tac ttc cac tcc atc	384
Val Val Val Asp Ile Met Gly Glu Lys Val Arg Tyr Phe His Ser Ile	
115 120 125	
aag aag ggc gtg cac cgc gtg tgg att gac cac ccc tgg ttc ctg gcc	432
Lys Lys Gly Val His Arg Val Trp Ile Asp His Pro Trp Phe Leu Ala	
130 135 140	
aag gtc tgg ggc aag acc ggc tcc aag ctg tac ggc ccc cgc tcc ggc	480
Lys Val Trp Gly Lys Thr Gly Ser Lys Leu Tyr Gly Pro Arg Ser Gly	
145 150 155 160	
gct gac tac ctg gac aac cac aag cgc ttc gcc ctg ttc tgc aag gcc	528
Ala Asp Tyr Leu Asp Asn His Lys Arg Phe Ala Leu Phe Cys Lys Ala	
165 170 175	
gct att gag gct gcc cgc gtg ctg ccc ttc gcc ccc ggc gag gac tgc	576
Ala Ile Glu Ala Ala Arg Val Leu Pro Phe Gly Pro Gly Glu Asp Cys	
180 185 190	
gtc ttc gtg gcc aac gac tgg cac tcc gcc ctg gtg ccc gtc ctg ctg	624
Val Phe Val Ala Asn Asp Trp His Ser Ala Leu Val Pro Val Leu Leu	
195 200 205	
aag gac gag tac cag ccc aag ggc cag ttc acc aag gcc aag tcg gtg	672
Lys Asp Glu Tyr Gln Pro Lys Gly Gln Phe Thr Lys Ala Lys Ser Val	
210 215 220	
ctg gct atc cac aac atc gcc ttc cag ggc cgc atg tgg gag gag gct	720
Leu Ala Ile His Asn Ile Ala Phe Gln Gly Arg Met Trp Glu Glu Ala	
225 230 235 240	
ttc aag gac acg aag ctg ccc cag gcc gcc ttt gac aag ctg gcc ttc	768
Phe Lys Asp Thr Lys Leu Pro Gln Ala Ala Phe Asp Lys Leu Ala Phe	
245 250 255	
tcg gac ggc tat gcc aag gtt tac act gag gcc acc ccc atg gag gag	816
Ser Asp Gly Tyr Ala Lys Val Tyr Thr Glu Ala Thr Pro Met Glu Glu	
260 265 270	
gac gag aag ccc ccg ctg acg gga aag acc tac aag aag atc aac tgg	864
Asp Glu Lys Pro Pro Leu Thr Gly Lys Thr Tyr Lys Lys Ile Asn Trp	
275 280 285	
ctg aag ggt ggc att atc gcc gcc gac aag ctg gtg act gtg tcg ccc	912
Leu Lys Gly Gly Ile Ile Ala Ala Asp Lys Leu Val Thr Val Ser Pro	
290 295 300	
aac tac gcg acc gag atc gct gcc gat gcc gcc ggc ggt gtg gag ctg	960
Asn Tyr Ala Thr Glu Ile Ala Ala Asp Ala Ala Gly Gly Val Glu Leu	
305 310 315 320	
gac acc gtc atc cgc gcc aag ggc att gag ggc att gtg aac ggc atg	1008
Asp Thr Val Ile Arg Ala Lys Gly Ile Glu Gly Ile Val Asn Gly Met	
325 330 335	
gac att gag gag tgg aac ccc aag acc gac aag ttc ctg tct gcg ccc	1056
Asp Ile Glu Glu Trp Asn Pro Lys Thr Asp Lys Phe Leu Ser Ala Pro	
340 345 350	

tac gac cag aac agc gtc tac gcc ggc aag gcc gcc gcc aag gag gcc	1104
Tyr Asp Gln Asn Ser Val Tyr Ala Gly Lys Ala Ala Lys Glu Ala	
355 360 365	
ctg cag gcc gag ctg ggc ctg cct gtg gac ccc acc gcc ccc ctg ttc	1152
Leu Gln Ala Glu Leu Gly Leu Pro Val Asp Pro Thr Ala Pro Leu Phe	
370 375 380	
gcc ttc atc ggc cgc ctg gag gag cag aag ggt gtg gac atc atc ctg	1200
Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Val Asp Ile Ile Leu	
385 390 395 400	
gcc gcc ctg ccc aag atc ctg gcc acc ccc aag gtg cag atc gcc atc	1248
Ala Ala Leu Pro Lys Ile Leu Ala Thr Pro Lys Val Gln Ile Ala Ile	
405 410 415	
ctg ggt acc ggc aag gcc gcc tac gag aag ctg gtg aac gcc atc ggc	1296
Leu Gly Thr Gly Lys Ala Ala Tyr Glu Lys Leu Val Asn Ala Ile Gly	
420 425 430	
acc aag tac aag ggc cgc gcc aag ggc gtg gtc aag ttc tcg gcg ccc	1344
Thr Lys Tyr Lys Gly Arg Ala Lys Gly Val Val Lys Phe Ser Ala Pro	
435 440 445	
ctg gcg cac atg ctc acc gcc ggc gcc gac ttc atg ctg gtg ccc tcg	1392
Leu Ala His Met Leu Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser	
450 455 460	
cgc ttc gag ccc tgc ggc ctg atc cag ctg cac gcc atg cac tac ggt	1440
Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met His Tyr Gly	
465 470 475 480	
acc gtg ccc gtg gta gcc tcc acc ggc ggc ctg gtc gac acc gtc aag	1488
Thr Val Pro Val Val Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Val Lys	
485 490 495	
gag ggc gtc acc ggc ttc cac atg ggc gcc ctg aac ccc gac aag ctg	1536
Glu Gly Val Thr Gly Phe His Met Gly Ala Leu Asn Pro Asp Lys Leu	
500 505 510	
gac gag gct gac gcc gac gcc ctg gcc gcc acc gtg cgc cgt gcc agc	1584
Asp Glu Ala Asp Ala Asp Ala Leu Ala Ala Thr Val Arg Arg Ala Ser	
515 520 525	
gag gtg ttt gcg ggc ggc cgc tac ccc gag atg gtg gcc aac tgc atc	1632
Glu Val Phe Ala Gly Gly Arg Tyr Pro Glu Met Val Ala Asn Cys Ile	
530 535 540	
agc cag gac ctg tcc tgg tcc aag ccc gcc cag aag tgg gag ggc ctg	1680
Ser Gln Asp Leu Ser Trp Ser Lys Pro Ala Gln Lys Trp Glu Gly Leu	
545 550 555 560	
ctg gag gag gtg gtg tac ggc aag ggc gcc gtg gcc acc gcc aag aag	1728
Leu Glu Glu Val Val Tyr Gly Lys Gly Gly Val Ala Thr Ala Lys Lys	
565 570 575	
gag gag atc aag gtg ccc gtt gcc gag aag atc ccc ggc gac ctg ccc	1776
Glu Glu Ile Lys Val Pro Val Ala Glu Lys Ile Pro Gly Asp Leu Pro	
580 585 590	

```

gcc gtg tcc tac gcc ccc aac acc ctg aag ccc gtg tcc gcc tcc gtg 1824
Ala Val Ser Tyr Ala Pro Asn Thr Leu Lys Pro Val Ser Ala Ser Val
      595                      600                      605

gag ggc aac ggc gcc gcc gcg ccc aag gtc ggc acc acc gcc ccc gcc 1872
Glu Gly Asn Gly Ala Ala Ala Pro Lys Val Gly Thr Thr Ala Pro Ala
      610                      615                      620

atg ggc gcg tgg cgc gcg acc acc ccc tcg ggc ccc tcg ccc gcc gcc 1920
Met Gly Ala Trp Arg Ala Thr Thr Pro Ser Gly Pro Ser Pro Ala Ala
      625                      630                      635                      640

gcc acc ccc aag gtg acc acc tac aag ccc gcc ctg ccc gcc acc gcc 1968
Ala Thr Pro Lys Val Thr Thr Tyr Lys Pro Ala Leu Pro Ala Thr Ala
      645                      650                      655

aag ccc aag acc gct ggc ctc aag ctg gcc ggt gag gcc tcc acc acc 2016
Lys Pro Lys Thr Ala Gly Leu Lys Leu Ala Gly Glu Ala Ser Thr Thr
      660                      665                      670

tcg acc tcg gag aac ggc gct gcc tcc aac ggc aac ggc aac ggt gcc 2064
Ser Thr Ser Glu Asn Gly Ala Ala Ser Asn Gly Asn Gly Asn Gly Ala
      675                      680                      685

tcg gcc tcc aag acc tcg gct gcc aag ccc ctg gtc tcc gcc gcc acc 2112
Ser Ala Ser Lys Thr Ser Ala Ala Lys Pro Leu Val Ser Ala Ala Thr
      690                      695                      700

cgc aag tcc gcc
Arg Lys Ser Ala
705

```

<210> 3

<211> 708

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence complète de l'ADNc codant la GBSSI
de Chlamydomonas reinhardtii

<400> 3

```

Met Ala Val Ala Ser Thr Ser Arg Pro Ser Ser Ala Arg Pro Ile Val
  1                      5                      10                      15

Ile Asn Ala Ala Ser Phe Gly Val Lys Lys Thr Ala Asn Gln Leu Leu
      20                      25                      30

Arg Glu Leu Ala Arg Gly Ser Ala Arg Lys Ser Thr Ser Arg Ser Ala
      35                      40                      45

Val Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Cys Ala Leu Asp Ile Val Met Val
      50                      55                      60

Ala Ala Glu Val Ala Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val
      65                      70                      75                      80

Thr Gly Gly Leu Pro Ile Glu Leu Val Lys Arg Gly His Arg Val Met
      85                      90                      95

```

Thr Ile Ala Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Ala Asp Ala Trp Asp Thr Ser
 100 105 110
 Val Val Val Asp Ile Met Gly Glu Lys Val Arg Tyr Phe His Ser Ile
 115 120 125
 Lys Lys Gly Val His Arg Val Trp Ile Asp His Pro Trp Phe Leu Ala
 130 135 140
 Lys Val Trp Gly Lys Thr Gly Ser Lys Leu Tyr Gly Pro Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Asp Tyr Leu Asp Asn His Lys Arg Phe Ala Leu Phe Cys Lys Ala
 165 170 175
 Ala Ile Glu Ala Ala Arg Val Leu Pro Phe Gly Pro Gly Glu Asp Cys
 180 185 190
 Val Phe Val Ala Asn Asp Trp His Ser Ala Leu Val Pro Val Leu Leu
 195 200 205
 Lys Asp Glu Tyr Gln Pro Lys Gly Gln Phe Thr Lys Ala Lys Ser Val
 210 215 220
 Leu Ala Ile His Asn Ile Ala Phe Gln Gly Arg Met Trp Glu Glu Ala
 225 230 235 240
 Phe Lys Asp Thr Lys Leu Pro Gln Ala Ala Phe Asp Lys Leu Ala Phe
 245 250 255
 Ser Asp Gly Tyr Ala Lys Val Tyr Thr Glu Ala Thr Pro Met Glu Glu
 260 265 270
 Asp Glu Lys Pro Pro Leu Thr Gly Lys Thr Tyr Lys Lys Ile Asn Trp
 275 280 285
 Leu Lys Gly Gly Ile Ile Ala Ala Asp Lys Leu Val Thr Val Ser Pro
 290 295 300
 Asn Tyr Ala Thr Glu Ile Ala Ala Asp Ala Ala Gly Gly Val Glu Leu
 305 310 315 320
 Asp Thr Val Ile Arg Ala Lys Gly Ile Glu Gly Ile Val Asn Gly Met
 325 330 335
 Asp Ile Glu Glu Trp Asn Pro Lys Thr Asp Lys Phe Leu Ser Ala Pro
 340 345 350
 Tyr Asp Gln Asn Ser Val Tyr Ala Gly Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala
 355 360 365
 Leu Gln Ala Glu Leu Gly Leu Pro Val Asp Pro Thr Ala Pro Leu Phe
 370 375 380
 Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly Val Asp Ile Ile Leu
 385 390 395 400
 Ala Ala Leu Pro Lys Ile Leu Ala Thr Pro Lys Val Gln Ile Ala Ile
 405 410 415

Leu Gly Thr Gly Lys Ala Ala Tyr Glu Lys Leu Val Asn Ala Ile Gly
 420 425 430
 Thr Lys Tyr Lys Gly Arg Ala Lys Gly Val Val Lys Phe Ser Ala Pro
 435 440 445
 Leu Ala His Met Leu Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser
 450 455 460
 Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met His Tyr Gly
 465 470 475 480
 Thr Val Pro Val Val Ala Ser Thr Gly Gly Leu Val Asp Thr Val Lys
 485 490 495
 Glu Gly Val Thr Gly Phe His Met Gly Ala Leu Asn Pro Asp Lys Leu
 500 505 510
 Asp Glu Ala Asp Ala Asp Ala Leu Ala Ala Thr Val Arg Arg Ala Ser
 515 520 525
 Glu Val Phe Ala Gly Gly Arg Tyr Pro Glu Met Val Ala Asn Cys Ile
 530 535 540
 Ser Gln Asp Leu Ser Trp Ser Lys Pro Ala Gln Lys Trp Glu Gly Leu
 545 550 555 560
 Leu Glu Glu Val Val Tyr Gly Lys Gly Gly Val Ala Thr Ala Lys Lys
 565 570 575
 Glu Glu Ile Lys Val Pro Val Ala Glu Lys Ile Pro Gly Asp Leu Pro
 580 585 590
 Ala Val Ser Tyr Ala Pro Asn Thr Leu Lys Pro Val Ser Ala Ser Val
 595 600 605
 Glu Gly Asn Gly Ala Ala Ala Pro Lys Val Gly Thr Thr Ala Pro Ala
 610 615 620
 Met Gly Ala Trp Arg Ala Thr Thr Pro Ser Gly Pro Ser Pro Ala Ala
 625 630 635 640
 Ala Thr Pro Lys Val Thr Thr Tyr Lys Pro Ala Leu Pro Ala Thr Ala
 645 650 655
 Lys Pro Lys Thr Ala Gly Leu Lys Leu Ala Gly Glu Ala Ser Thr Thr
 660 665 670
 Ser Thr Ser Glu Asn Gly Ala Ala Ser Asn Gly Asn Gly Asn Gly Ala
 675 680 685
 Ser Ala Ser Lys Thr Ser Ala Ala Lys Pro Leu Val Ser Ala Ala Thr
 690 695 700
 Arg Lys Ser Ala
 705

<210> 4
 <211> 1953
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de l'ADNc complet codant la GBSSI de Chlamydomonas
 reinhardtii et codant la protéine GBSSI mature

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1953)

<400> 4
 gcg ctg gac atc gtg atg gtt gct gct gag gtc gcc cct tgg tcc aag 48
 Ala Leu Asp Ile Val Met Val Ala Ala Glu Val Ala Pro Trp Ser Lys
 1 5 10 15
 acg ggc ggc ctg ggc gat gtg act ggt ggc ctg cct att gag ctg gtc 96
 Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Thr Gly Gly Leu Pro Ile Glu Leu Val
 20 25 30
 aag cgc ggc cac cgc gtc atg acc att gcc cct cgc tac gac cag tac 144
 Lys Arg Gly His Arg Val Met Thr Ile Ala Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr
 35 40 45
 gct gac gcc tgg gac acc tcg gtg gtc gtg gac atc atg ggc gag aag 192
 Ala Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Val Val Asp Ile Met Gly Glu Lys
 50 55 60
 gtc cgc tac ttc cac tcc atc aag aag ggc gtg cac cgc gtg tgg att 240
 Val Arg Tyr Phe His Ser Ile Lys Lys Gly Val His Arg Val Trp Ile
 65 70 75 80
 gac cac ccc tgg ttc ctg gcc aag gtc tgg ggc aag acc ggc tcc aag 288
 Asp His Pro Trp Phe Leu Ala Lys Val Trp Gly Lys Thr Gly Ser Lys
 85 90 95
 ctg tac ggc ccc cgc tcc ggc gct gac tac ctg gac aac cac aag cgc 336
 Leu Tyr Gly Pro Arg Ser Gly Ala Asp Tyr Leu Asp Asn His Lys Arg
 100 105 110
 ttc gcc ctg ttc tgc aag gcc gct att gag gct gcc cgc gtg ctg ccc 384
 Phe Ala Leu Phe Cys Lys Ala Ala Ile Glu Ala Ala Arg Val Leu Pro
 115 120 125
 ttc ggc ccc ggc gag gac tgc gtc ttc gtg gcc aac gac tgg cac tcc 432
 Phe Gly Pro Gly Glu Asp Cys Val Phe Val Ala Asn Asp Trp His Ser
 130 135 140
 gcc ctg gtg ccc gtc ctg ctg aag gac gag tac cag ccc aag ggc cag 480
 Ala Leu Val Pro Val Leu Leu Lys Asp Glu Tyr Gln Pro Lys Gly Gln
 145 150 155 160
 ttc acc aag gcc aag tcg gtg ctg gct atc cac aac atc gcc ttc cag 528
 Phe Thr Lys Ala Lys Ser Val Leu Ala Ile His Asn Ile Ala Phe Gln
 165 170 175

ggc cgc atg tgg gag gag gct ttc aag gac acg aag ctg ccc cag gcc	576
Gly Arg Met Trp Glu Glu Ala Phe Lys Asp Thr Lys Leu Pro Gln Ala	
180 185 190	
gcc ttt gac aag ctg gcc ttc tcg gac ggc tat gcc aag gtt tac act	624
Ala Phe Asp Lys Leu Ala Phe Ser Asp Gly Tyr Ala Lys Val Tyr Thr	
195 200 205	
gag gcc acc ccc atg gag gag gac gag aag ccc ccg ctg acg gga aag	672
Glu Ala Thr Pro Met Glu Glu Asp Glu Lys Pro Pro Leu Thr Gly Lys	
210 215 220	
acc tac aag aag atc aac tgg ctg aag ggt ggc att atc gcc gcc gac	720
Thr Tyr Lys Lys Ile Asn Trp Leu Lys Gly Gly Ile Ile Ala Ala Asp	
225 230 235 240	
aag ctg gtg act gtg tcg ccc aac tac gcg acc gag atc gct gcc gat	768
Lys Leu Val Thr Val Ser Pro Asn Tyr Ala Thr Glu Ile Ala Ala Asp	
245 250 255	
gcc gcc ggc ggt gtg gag ctg gac acc gtc atc cgc gcc aag ggc att	816
Ala Ala Gly Gly Val Glu Leu Asp Thr Val Ile Arg Ala Lys Gly Ile	
260 265 270	
gag ggc att gtg aac ggc atg gac att gag gag tgg aac ccc aag acc	864
Glu Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Ile Glu Glu Trp Asn Pro Lys Thr	
275 280 285	
gac aag ttc ctg tct gcg ccc tac gac cag aac agc gtc tac gcc ggc	912
Asp Lys Phe Leu Ser Ala Pro Tyr Asp Gln Asn Ser Val Tyr Ala Gly	
290 295 300	
aag gcc gcc gcc aag gag gcc ctg cag gcc gag ctg ggc ctg cct gtg	960
Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Leu Gly Leu Pro Val	
305 310 315 320	
gac ccc acc gcc ccc ctg ttc gcc ttc atc ggc cgc ctg gag gag cag	1008
Asp Pro Thr Ala Pro Leu Phe Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln	
325 330 335	
aag ggt gtg gac atc atc ctg gcc gcc ctg ccc aag atc ctg gcc acc	1056
Lys Gly Val Asp Ile Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Ile Leu Ala Thr	
340 345 350	
ccc aag gtg cag atc gcc atc ctg ggt acc ggc aag gcc gcc tac gag	1104
Pro Lys Val Gln Ile Ala Ile Leu Gly Thr Gly Lys Ala Ala Tyr Glu	
355 360 365	
aag ctg gtg aac gcc atc ggc acc aag tac aag ggc cgc gcc aag ggc	1152
Lys Leu Val Asn Ala Ile Gly Thr Lys Tyr Lys Gly Arg Ala Lys Gly	
370 375 380	
gtg gtc aag ttc tcg gcg ccc ctg gcg cac atg ctc acc gcc ggc gcc	1200
Val Val Lys Phe Ser Ala Pro Leu Ala His Met Leu Thr Ala Gly Ala	
385 390 395 400	
gac ttc atg ctg gtg ccc tcg cgc ttc gag ccc tgc ggc ctg atc cag	1248
Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln	
405 410 415	

ctg cac gcc atg cac tac ggt acc gtg ccc gtg gta gcc tcc acc ggc	1296
Leu His Ala Met His Tyr Gly Thr Val Pro Val Val Ala Ser Thr Gly	
420 425 430	
ggc ctg gtc gac acc gtc aag gag ggc gtc acc ggc ttc cac atg ggc	1344
Gly Leu Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Val Thr Gly Phe His Met Gly	
435 440 445	
gcc ctg aac ccc gac aag ctg gac gag gct gac gcc gac gcc ctg gcc	1392
Ala Leu Asn Pro Asp Lys Leu Asp Glu Ala Asp Ala Asp Ala Leu Ala	
450 455 460	
gcc acc gtg cgc cgt gcc agc gag gtg ttt gcg ggc ggc cgc tac ccc	1440
Ala Thr Val Arg Arg Ala Ser Glu Val Phe Ala Gly Gly Arg Tyr Pro	
465 470 475 480	
gag atg gtg gcc aac tgc atc agc cag gac ctg tcc tgg tcc aag ccc	1488
Glu Met Val Ala Asn Cys Ile Ser Gln Asp Leu Ser Trp Ser Lys Pro	
485 490 495	
gcc cag aag tgg gag ggc ctg ctg gag gag gtg gtg tac ggc aag ggc	1536
Ala Gln Lys Trp Glu Gly Leu Leu Glu Glu Val Val Tyr Gly Lys Gly	
500 505 510	
ggc gtg gcc acc gcc aag aag gag gag atc aag gtg ccc gtt gcc gag	1584
Gly Val Ala Thr Ala Lys Lys Glu Glu Ile Lys Val Pro Val Ala Glu	
515 520 525	
aag atc ccc ggc gac ctg ccc gcc gtg tcc tac gcc ccc aac acc ctg	1632
Lys Ile Pro Gly Asp Leu Pro Ala Val Ser Tyr Ala Pro Asn Thr Leu	
530 535 540	
aag ccc gtg tcc gcc tcc gtg gag ggc aac ggc gcc gcc gcg ccc aag	1680
Lys Pro Val Ser Ala Ser Val Glu Gly Asn Gly Ala Ala Ala Pro Lys	
545 550 555 560	
gtc ggc acc acc gcc ccc gcc atg ggc gcg tgg cgc gcg acc acc ccc	1728
Val Gly Thr Thr Ala Pro Ala Met Gly Ala Trp Arg Ala Thr Thr Pro	
565 570 575	
tcg ggc ccc tcg ccc gcc gcc gcc acc ccc aag gtg acc acc tac aag	1776
Ser Gly Pro Ser Pro Ala Ala Ala Thr Pro Lys Val Thr Thr Tyr Lys	
580 585 590	
ccc gcc ctg ccc gcc acc gcc aag ccc aag acc gct ggc ctc aag ctg	1824
Pro Ala Leu Pro Ala Thr Ala Lys Pro Lys Thr Ala Gly Leu Lys Leu	
595 600 605	
gcc ggt gag gcc tcc acc acc tcg acc tcg gag aac ggc gct gcc tcc	1872
Ala Gly Glu Ala Ser Thr Thr Ser Thr Ser Glu Asn Gly Ala Ala Ser	
610 615 620	
aac ggc aac ggc aac ggt gcc tcg gcc tcc aag acc tcg gct gcc aag	1920
Asn Gly Asn Gly Asn Gly Ala Ser Ala Ser Lys Thr Ser Ala Ala Lys	
625 630 635 640	
ccc ctg gtc tcc gcc gcc acc cgc aag tcc gcc	1953
Pro Leu Val Ser Ala Ala Thr Arg Lys Ser Ala	
645 650	

<210> 5

<211> 651

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de l'ADNc complet codant la GBSSI de Chlamydomonas
reinhardtii et codant la protéine GBSSI mature

<400> 5

Ala Leu Asp Ile Val Met Val Ala Ala Glu Val Ala Pro Trp Ser Lys
1 5 10 15

Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Thr Gly Gly Leu Pro Ile Glu Leu Val
20 25 30

Lys Arg Gly His Arg Val Met Thr Ile Ala Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr
35 40 45

Ala Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Val Val Asp Ile Met Gly Glu Lys
50 55 60

Val Arg Tyr Phe His Ser Ile Lys Lys Gly Val His Arg Val Trp Ile
65 70 75 80

Asp His Pro Trp Phe Leu Ala Lys Val Trp Gly Lys Thr Gly Ser Lys
85 90 95

Leu Tyr Gly Pro Arg Ser Gly Ala Asp Tyr Leu Asp Asn His Lys Arg
100 105 110

Phe Ala Leu Phe Cys Lys Ala Ala Ile Glu Ala Ala Arg Val Leu Pro
115 120 125

Phe Gly Pro Gly Glu Asp Cys Val Phe Val Ala Asn Asp Trp His Ser
130 135 140

Ala Leu Val Pro Val Leu Leu Lys Asp Glu Tyr Gln Pro Lys Gly Gln
145 150 155 160

Phe Thr Lys Ala Lys Ser Val Leu Ala Ile His Asn Ile Ala Phe Gln
165 170 175

Gly Arg Met Trp Glu Glu Ala Phe Lys Asp Thr Lys Leu Pro Gln Ala
180 185 190

Ala Phe Asp Lys Leu Ala Phe Ser Asp Gly Tyr Ala Lys Val Tyr Thr
195 200 205

Glu Ala Thr Pro Met Glu Glu Asp Glu Lys Pro Pro Leu Thr Gly Lys
210 215 220

Thr Tyr Lys Lys Ile Asn Trp Leu Lys Gly Gly Ile Ile Ala Ala Asp
225 230 235 240

Lys Leu Val Thr Val Ser Pro Asn Tyr Ala Thr Glu Ile Ala Ala Asp
245 250 255

Ala Ala Gly Gly Val Glu Leu Asp Thr Val Ile Arg Ala Lys Gly Ile
260 265 270

Glu Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Ile Glu Glu Trp Asn Pro Lys Thr
 275 280 285
 Asp Lys Phe Leu Ser Ala Pro Tyr Asp Gln Asn Ser Val Tyr Ala Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Leu Gly Leu Pro Val
 305 310 315 320
 Asp Pro Thr Ala Pro Leu Phe Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln
 325 330 335
 Lys Gly Val Asp Ile Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Ile Leu Ala Thr
 340 345 350
 Pro Lys Val Gln Ile Ala Ile Leu Gly Thr Gly Lys Ala Ala Tyr Glu
 355 360 365
 Lys Leu Val Asn Ala Ile Gly Thr Lys Tyr Lys Gly Arg Ala Lys Gly
 370 375 380
 Val Val Lys Phe Ser Ala Pro Leu Ala His Met Leu Thr Ala Gly Ala
 385 390 395 400
 Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln
 405 410 415
 Leu His Ala Met His Tyr Gly Thr Val Pro Val Val Ala Ser Thr Gly
 420 425 430
 Gly Leu Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Val Thr Gly Phe His Met Gly
 435 440 445
 Ala Leu Asn Pro Asp Lys Leu Asp Glu Ala Asp Ala Asp Ala Leu Ala
 450 455 460
 Ala Thr Val Arg Arg Ala Ser Glu Val Phe Ala Gly Gly Arg Tyr Pro
 465 470 475 480
 Glu Met Val Ala Asn Cys Ile Ser Gln Asp Leu Ser Trp Ser Lys Pro
 485 490 495
 Ala Gln Lys Trp Glu Gly Leu Leu Glu Glu Val Val Tyr Gly Lys Gly
 500 505 510
 Gly Val Ala Thr Ala Lys Lys Glu Glu Ile Lys Val Pro Val Ala Glu
 515 520 525
 Lys Ile Pro Gly Asp Leu Pro Ala Val Ser Tyr Ala Pro Asn Thr Leu
 530 535 540
 Lys Pro Val Ser Ala Ser Val Glu Gly Asn Gly Ala Ala Ala Pro Lys
 545 550 555 560
 Val Gly Thr Thr Ala Pro Ala Met Gly Ala Trp Arg Ala Thr Thr Pro
 565 570 575
 Ser Gly Pro Ser Pro Ala Ala Ala Thr Pro Lys Val Thr Thr Tyr Lys
 580 585 590

Pro Ala Leu Pro Ala Thr Ala Lys Pro Lys Thr Ala Gly Leu Lys Leu
595 600 605

Ala Gly Glu Ala Ser Thr Thr Ser Thr Ser Glu Asn Gly Ala Ala Ser
610 615 620

Asn Gly Asn Gly Asn Gly Ala Ser Ala Ser Lys Thr Ser Ala Ala Lys
625 630 635 640

Pro Leu Val Ser Ala Ala Thr Arg Lys Ser Ala
645 650

```
<210> 6
<211> 1314
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
```

<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de l'ADNc complet codant la GBSSI de *Chlamydomonas*
reinhardtii

```
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1314)
```

<400>	6																
gcg	ctg	gac	atc	gtg	atg	gtt	gct	gct	gag	gtc	gcc	cct	tgg	tcc	aag		48
Ala	Leu	Asp	Ile	Val	Met	Val	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Pro	Trp	Ser	Lys		
	1				5				10					15			
acg	ggc	ggc	ctg	ggc	gat	gtg	act	ggt	ggc	ctg	cct	att	gag	ctg	gtc		96
Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Thr	Gly	Gly	Leu	Pro	Ile	Glu	Leu	Val		
			20					25					30				
aag	cgc	ggc	cac	cgc	gtc	atg	acc	att	gcc	cct	cgc	tac	gac	cag	tac		144
Lys	Arg	Gly	His	Arg	Val	Met	Thr	Ile	Ala	Pro	Arg	Tyr	Asp	Gln	Tyr		
		35					40					45					
gct	gac	gcc	tgg	gac	acc	tcg	gtg	gtc	gtg	gac	atc	atg	ggc	gag	aag		192
Ala	Asp	Ala	Trp	Asp	Thr	Ser	Val	Val	Val	Asp	Ile	Met	Gly	Glu	Lys		
	50					55					60						
gtc	cgc	tac	ttc	cac	tcc	atc	aag	aag	ggc	gtg	cac	cgc	gtg	tgg	att		240
Val	Arg	Tyr	Phe	His	Ser	Ile	Lys	Lys	Gly	Val	His	Arg	Val	Trp	Ile		
	65				70				75						80		
gac	cac	ccc	tgg	ttc	ctg	gcc	aag	gtc	tgg	ggc	aag	acc	ggc	tcc	aag		288
Asp	His	Pro	Trp	Phe	Leu	Ala	Lys	Val	Trp	Gly	Lys	Thr	Gly	Ser	Lys		
				85					90					95			
ctg	tac	ggc	ccc	cgc	tcc	ggc	gct	gac	tac	ctg	gac	aac	cac	aag	cgc		336
Leu	Tyr	Gly	Pro	Arg	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Leu	Asp	Asn	His	Lys	Arg		
			100					105					110				
ttc	gcc	ctg	ttc	tgc	aag	gcc	gct	att	gag	gct	gcc	cgc	gtg	ctg	ccc		384
Phe	Ala	Leu	Phe	Cys	Lys	Ala	Ala	Ile	Glu	Ala	Ala	Arg	Val	Leu	Pro		
		115					120					125					

ttc ggc ccc ggc gag gac tgc gtc ttc gtg gcc aac gac tgg cac tcc	432
Phe Gly Pro Gly Glu Asp Cys Val Phe Val Ala Asn Asp Trp His Ser	
130 135 140	
gcc ctg gtg ccc gtc ctg ctg aag gac gag tac cag ccc aag ggc cag	480
Ala Leu Val Pro Val Leu Leu Lys Asp Glu Tyr Gln Pro Lys Gly Gln	
145 150 155 160	
ttc acc aag gcc aag tgc gtg ctg gct atc cac aac atc gcc ttc cag	528
Phe Thr Lys Ala Lys Ser Val Leu Ala Ile His Asn Ile Ala Phe Gln	
165 170 175	
ggc cgc atg tgg gag gag gct ttc aag gac acg aag ctg ccc cag gcc	576
Gly Arg Met Trp Glu Glu Ala Phe Lys Asp Thr Lys Leu Pro Gln Ala	
180 185 190	
gcc ttt gac aag ctg gcc ttc tgc gac ggc tat gcc aag gtt tac act	624
Ala Phe Asp Lys Leu Ala Phe Ser Asp Gly Tyr Ala Lys Val Tyr Thr	
195 200 205	
gag gcc acc ccc atg gag gag gac gag aag ccc ccg ctg acg gga aag	672
Glu Ala Thr Pro Met Glu Glu Asp Glu Lys Pro Pro Leu Thr Gly Lys	
210 215 220	
acc tac aag aag atc aac tgg ctg aag ggt ggc att atc gcc gcc gac	720
Thr Tyr Lys Lys Ile Asn Trp Leu Lys Gly Gly Ile Ile Ala Ala Asp	
225 230 235 240	
aag ctg gtg act gtg tgc ccc aac tac gcg acc gag atc gct gcc gat	768
Lys Leu Val Thr Val Ser Pro Asn Tyr Ala Thr Glu Ile Ala Ala Asp	
245 250 255	
gcc gcc ggc ggt gtg gag ctg gac acc gtc atc cgc gcc aag ggc att	816
Ala Ala Gly Gly Val Glu Leu Asp Thr Val Ile Arg Ala Lys Gly Ile	
260 265 270	
gag ggc att gtg aac ggc atg gac att gag gag tgg aac ccc aag acc	864
Glu Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Ile Glu Glu Trp Asn Pro Lys Thr	
275 280 285	
gac aag ttc ctg tct gcg ccc tac gac cag aac agc gtc tac gcc ggc	912
Asp Lys Phe Leu Ser Ala Pro Tyr Asp Gln Asn Ser Val Tyr Ala Gly	
290 295 300	
aag gcc gcc gcc aag gag gcc ctg cag gcc gag ctg ggc ctg cct gtg	960
Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Leu Gly Leu Pro Val	
305 310 315 320	
gac ccc acc gcc ccc ctg ttc gcc ttc atc ggc cgc ctg gag gag cag	1008
Asp Pro Thr Ala Pro Leu Phe Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln	
325 330 335	
aag ggt gtg gac atc atc ctg gcc gcc ctg ccc aag atc ctg gcc acc	1056
Lys Gly Val Asp Ile Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Ile Leu Ala Thr	
340 345 350	
ccc aag gtg cag atc gcc atc ctg ggt acc ggc aag gcc gcc tac gag	1104
Pro Lys Val Gln Ile Ala Ile Leu Gly Thr Gly Lys Ala Ala Tyr Glu	
355 360 365	

aag ctg gtg aac gcc atc ggc acc aag tac aag ggc cgc gcc aag ggc 1152
 Lys Leu Val Asn Ala Ile Gly Thr Lys Tyr Lys Gly Arg Ala Lys Gly
 370 375 380

gtg gtc aag ttc tcg gcg ccc ctg gcg cac atg ctc acc gcc ggc gcc 1200
 Val Val Lys Phe Ser Ala Pro Leu Ala His Met Leu Thr Ala Gly Ala
 385 390 395 400

gac ttc atg ctg gtg ccc tcg cgc ttc gag ccc tgc ggc ctg atc cag 1248
 Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln
 405 410 415

ctg cac gcc atg cac tac ggt acc gtg ccc gtg gta gcc tcc acc ggc 1296
 Leu His Ala Met His Tyr Gly Thr Val Pro Val Val Ala Ser Thr Gly
 420 425 430

ggc ctg gtc gac acc gtc 1314
 Gly Leu Val Asp Thr Val
 435

<210> 7

<211> 438

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de l'ADNc complet codant la GBSSI de Chlamydomonas
 reinhardtii

<400> 7

Ala Leu Asp Ile Val Met Val Ala Ala Glu Val Ala Pro Trp Ser Lys
 1 5 10 15

Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Thr Gly Gly Leu Pro Ile Glu Leu Val
 20 25 30

Lys Arg Gly His Arg Val Met Thr Ile Ala Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr
 35 40 45

Ala Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Val Val Asp Ile Met Gly Glu Lys
 50 55 60

Val Arg Tyr Phe His Ser Ile Lys Lys Gly Val His Arg Val Trp Ile
 65 70 75 80

Asp His Pro Trp Phe Leu Ala Lys Val Trp Gly Lys Thr Gly Ser Lys
 85 90 95

Leu Tyr Gly Pro Arg Ser Gly Ala Asp Tyr Leu Asp Asn His Lys Arg
 100 105 110

Phe Ala Leu Phe Cys Lys Ala Ala Ile Glu Ala Ala Arg Val Leu Pro
 115 120 125

Phe Gly Pro Gly Glu Asp Cys Val Phe Val Ala Asn Asp Trp His Ser
 130 135 140

Ala Leu Val Pro Val Leu Leu Lys Asp Glu Tyr Gln Pro Lys Gly Gln
 145 150 155 160

Phe Thr Lys Ala Lys Ser Val Leu Ala Ile His Asn Ile Ala Phe Gln
 165 170 175
 Gly Arg Met Trp Glu Glu Ala Phe Lys Asp Thr Lys Leu Pro Gln Ala
 180 185 190
 Ala Phe Asp Lys Leu Ala Phe Ser Asp Gly Tyr Ala Lys Val Tyr Thr
 195 200 205
 Glu Ala Thr Pro Met Glu Glu Asp Glu Lys Pro Pro Leu Thr Gly Lys
 210 215 220
 Thr Tyr Lys Lys Ile Asn Trp Leu Lys Gly Gly Ile Ile Ala Ala Asp
 225 230 235 240
 Lys Leu Val Thr Val Ser Pro Asn Tyr Ala Thr Glu Ile Ala Ala Asp
 245 250 255
 Ala Ala Gly Gly Val Glu Leu Asp Thr Val Ile Arg Ala Lys Gly Ile
 260 265 270
 Glu Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Ile Glu Glu Trp Asn Pro Lys Thr
 275 280 285
 Asp Lys Phe Leu Ser Ala Pro Tyr Asp Gln Asn Ser Val Tyr Ala Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Leu Gly Leu Pro Val
 305 310 315 320
 Asp Pro Thr Ala Pro Leu Phe Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln
 325 330 335
 Lys Gly Val Asp Ile Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Ile Leu Ala Thr
 340 345 350
 Pro Lys Val Gln Ile Ala Ile Leu Gly Thr Gly Lys Ala Ala Tyr Glu
 355 360 365
 Lys Leu Val Asn Ala Ile Gly Thr Lys Tyr Lys Gly Arg Ala Lys Gly
 370 375 380
 Val Val Lys Phe Ser Ala Pro Leu Ala His Met Leu Thr Ala Gly Ala
 385 390 395 400
 Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln
 405 410 415
 Leu His Ala Met His Tyr Gly Thr Val Pro Val Val Ala Ser Thr Gly
 420 425 430
 Gly Leu Val Asp Thr Val
 435

<210> 8

<211> 1593

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de l'ADNc complet codant la GBSSI de Chlamydomonas
reinhardtii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1593)

<400> 8

gcg	ctg	gac	atc	gtg	atg	gtt	gct	gct	gag	gtc	gcc	cct	tgg	tcc	aag	48
Ala	Leu	Asp	Ile	Val	Met	Val	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Pro	Trp	Ser	Lys	
1				5					10					15		
acg	ggc	ggc	ctg	ggc	gat	gtg	act	ggt	ggc	ctg	cct	att	gag	ctg	gtc	96
Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Thr	Gly	Gly	Leu	Pro	Ile	Glu	Leu	Val	
			20					25					30			
aag	cgc	ggc	cac	cgc	gtc	atg	acc	att	gcc	cct	cgc	tac	gac	cag	tac	144
Lys	Arg	Gly	His	Arg	Val	Met	Thr	Ile	Ala	Pro	Arg	Tyr	Asp	Gln	Tyr	
		35					40					45				
gct	gac	gcc	tgg	gac	acc	tcg	gtg	gtc	gtg	gac	atc	atg	ggc	gag	aag	192
Ala	Asp	Ala	Trp	Asp	Thr	Ser	Val	Val	Val	Asp	Ile	Met	Gly	Glu	Lys	
	50					55				60						
gtc	cgc	tac	ttc	cac	tcc	atc	aag	aag	ggc	gtg	cac	cgc	gtg	tgg	att	240
Val	Arg	Tyr	Phe	His		Ile	Lys	Lys	Gly	Val	His	Arg	Val	Trp	Ile	
65				70					75					80		
gac	cac	ccc	tgg	ttc	ctg	gcc	aag	gtc	tgg	ggc	aag	acc	ggc	tcc	aag	288
Asp	His	Pro	Trp	Phe	Leu	Ala	Lys	Val	Trp	Gly	Lys	Thr	Gly	Ser	Lys	
				85				90						95		
ctg	tac	ggc	ccc	cgc	tcc	ggc	gct	gac	tac	ctg	gac	aac	cac	aag	cgc	336
Leu	Tyr	Gly	Pro	Arg	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Leu	Asp	Asn	His	Lys	Arg	
			100					105					110			
ttc	gcc	ctg	ttc	tgc	aag	gcc	gct	att	gag	gct	gcc	cgc	gtg	ctg	ccc	384
Phe	Ala	Leu	Phe	Cys	Lys	Ala	Ala	Ile	Glu	Ala	Ala	Arg	Val	Leu	Pro	
	115					120						125				
ttc	ggc	ccc	ggc	gag	gac	tgc	gtc	ttc	gtg	gcc	aac	gac	tgg	cac	tcc	432
Phe	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys	Val	Phe	Val	Ala	Asn	Asp	Trp	His	Ser	
	130				135						140					
gcc	ctg	gtg	ccc	gtc	ctg	ctg	aag	gac	gag	tac	cag	ccc	aag	ggc	cag	480
Ala	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Lys	Asp	Glu	Tyr	Gln	Pro	Lys	Gly	Gln	
145				150					155					160		
ttc	acc	aag	gcc	aag	tcg	gtg	ctg	gct	atc	cac	aac	atc	gcc	ttc	cag	528
Phe	Thr	Lys	Ala	Lys	Ser	Val	Leu	Ala	Ile	His	Asn	Ile	Ala	Phe	Gln	
				165				170						175		
ggc	cgc	atg	tgg	gag	gag	gct	ttc	aag	gac	acg	aag	ctg	ccc	cag	gcc	576
Gly	Arg	Met	Trp	Glu	Glu	Ala	Phe	Lys	Asp	Thr	Lys	Leu	Pro	Gln	Ala	
			180					185					190			
gcc	ttt	gac	aag	ctg	gcc	ttc	tcg	gac	ggc	tat	gcc	aag	gtt	tac	act	624
Ala	Phe	Asp	Lys	Leu	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Tyr	Ala	Lys	Val	Tyr	Thr	
		195					200					205				

gag gcc acc ccc atg gag gag gac gag aag ccc ccg ctg acg gga aag	672
Glu Ala Thr Pro Met Glu Glu Asp Glu Lys Pro Pro Leu Thr Gly Lys	
210 215 220	
acc tac aag aag atc aac tgg ctg aag ggt ggc att atc gcc gcc gac	720
Thr Tyr Lys Lys Ile Asn Trp Leu Lys Gly Gly Ile Ile Ala Ala Asp	
225 230 235 240	
aag ctg gtg act gtg tcg ccc aac tac gcg acc gag atc gct gcc gat	768
Lys Leu Val Thr Val Ser Pro Asn Tyr Ala Thr Glu Ile Ala Ala Asp	
245 250 255	
gcc gcc ggc ggt gtg gag ctg gac acc gtc atc cgc gcc aag ggc att	816
Ala Ala Gly Gly Val Glu Leu Asp Thr Val Ile Arg Ala Lys Gly Ile	
260 265 270	
gag ggc att gtg aac ggc atg gac att gag gag tgg aac ccc aag acc	864
Glu Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Ile Glu Glu Trp Asn Pro Lys Thr	
275 280 285	
gac aag ttc ctg tct gcg ccc tac gac cag aac agc gtc tac gcc ggc	912
Asp Lys Phe Leu Ser Ala Pro Tyr Asp Gln Asn Ser Val Tyr Ala Gly	
290 295 300	
aag gcc gcc gcc aag gag gcc ctg cag gcc gag ctg ggc ctg cct gtg	960
Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Leu Gly Leu Pro Val	
305 310 315 320	
gac ccc acc gcc ccc ctg ttc gcc ttc atc ggc cgc ctg gag gag cag	1008
Asp Pro Thr Ala Pro Leu Phe Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln	
325 330 335	
aag ggt gtg gac atc atc ctg gcc gcc ctg ccc aag atc ctg gcc acc	1056
Lys Gly Val Asp Ile Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Ile Leu Ala Thr	
340 345 350	
ccc aag gtg cag atc gcc atc ctg ggt acc ggc aag gcc gcc tac gag	1104
Pro Lys Val Gln Ile Ala Ile Leu Gly Thr Gly Lys Ala Ala Tyr Glu	
355 360 365	
aag ctg gtg aac gcc atc ggc acc aag tac aag ggc cgc gcc aag ggc	1152
Lys Leu Val Asn Ala Ile Gly Thr Lys Tyr Lys Gly Arg Ala Lys Gly	
370 375 380	
gtg gtc aag ttc tcg gcg ccc ctg gcg cac atg ctc acc gcc ggc gcc	1200
Val Val Lys Phe Ser Ala Pro Leu Ala His Met Leu Thr Ala Gly Ala	
385 390 395 400	
gac ttc atg ctg gtg ccc tcg cgc ttc gag ccc tgc ggc ctg atc cag	1248
Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln	
405 410 415	
ctg cac gcc atg cac tac ggt acc gtg ccc gtg gta gcc tcc acc ggc	1296
Leu His Ala Met His Tyr Gly Thr Val Pro Val Val Ala Ser Thr Gly	
420 425 430	
ggc ctg gtc gac acc gtc aag gag ggc gtc acc ggc ttc cac atg ggc	1344
Gly Leu Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Val Thr Gly Phe His Met Gly	
435 440 445	

gcc ctg aac ccc gac aag ctg gac gag gct gac gcc gac gcc ctg gcc 1392
 Ala Leu Asn Pro Asp Lys Leu Asp Glu Ala Asp Ala Asp Ala Leu Ala
 450 455 460

gcc acc gtg cgc cgt gcc agc gag gtg ttt gcg ggc ggc cgc tac ccc 1440
 Ala Thr Val Arg Arg Ala Ser Glu Val Phe Ala Gly Gly Arg Tyr Pro
 465 470 475 480

gag atg gtg gcc aac tgc atc agc cag gac ctg tcc tgg tcc aag ccc 1488
 Glu Met Val Ala Asn Cys Ile Ser Gln Asp Leu Ser Trp Ser Lys Pro
 485 490 495

gcc cag aag tgg gag ggc ctg ctg gag gag gtg gtg tac ggc aag ggc 1536
 Ala Gln Lys Trp Glu Gly Leu Leu Glu Glu Val Val Tyr Gly Lys Gly
 500 505 510

ggc gtg gcc acc gcc aag aag gag gag atc aag gtg ccc gtt gcc gag 1584
 Gly Val Ala Thr Ala Lys Lys Glu Glu Ile Lys Val Pro Val Ala Glu
 515 520 525

aag atc ccc 1593
 Lys Ile Pro
 530

<210> 9

<211> 531

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de l'ADNc complet codant la GBSSI de Chlamydomonas
 reinhardtii

<400> 9

Ala Leu Asp Ile Val Met Val Ala Ala Glu Val Ala Pro Trp Ser Lys
 1 5 10 15

Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Thr Gly Gly Leu Pro Ile Glu Leu Val
 20 25 30

Lys Arg Gly His Arg Val Met Thr Ile Ala Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr
 35 40 45

Ala Asp Ala Trp Asp Thr Ser Val Val Val Asp Ile Met Gly Glu Lys
 50 55 60

Val Arg Tyr Phe His Ser Ile Lys Lys Gly Val His Arg Val Trp Ile
 65 70 75 80

Asp His Pro Trp Phe Leu Ala Lys Val Trp Gly Lys Thr Gly Ser Lys
 85 90 95

Leu Tyr Gly Pro Arg Ser Gly Ala Asp Tyr Leu Asp Asn His Lys Arg
 100 105 110

Phe Ala Leu Phe Cys Lys Ala Ala Ile Glu Ala Ala Arg Val Leu Pro
 115 120 125

Phe Gly Pro Gly Glu Asp Cys Val Phe Val Ala Asn Asp Trp His Ser
 130 135 140

Ala Leu Val Pro Val Leu Leu Lys Asp Glu Tyr Gln Pro Lys Gly Gln
 145 150 155 160
 Phe Thr Lys Ala Lys Ser Val Leu Ala Ile His Asn Ile Ala Phe Gln
 165 170 175
 Gly Arg Met Trp Glu Glu Ala Phe Lys Asp Thr Lys Leu Pro Gln Ala
 180 185 190
 Ala Phe Asp Lys Leu Ala Phe Ser Asp Gly Tyr Ala Lys Val Tyr Thr
 195 200 205
 Glu Ala Thr Pro Met Glu Glu Asp Glu Lys Pro Pro Leu Thr Gly Lys
 210 215 220
 Thr Tyr Lys Lys Ile Asn Trp Leu Lys Gly Gly Ile Ile Ala Ala Asp
 225 230 235 240
 Lys Leu Val Thr Val Ser Pro Asn Tyr Ala Thr Glu Ile Ala Ala Asp
 245 250 255
 Ala Ala Gly Gly Val Glu Leu Asp Thr Val Ile Arg Ala Lys Gly Ile
 260 265 270
 Glu Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Ile Glu Glu Trp Asn Pro Lys Thr
 275 280 285
 Asp Lys Phe Leu Ser Ala Pro Tyr Asp Gln Asn Ser Val Tyr Ala Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Ala Glu Leu Gly Leu Pro Val
 305 310 315 320
 Asp Pro Thr Ala Pro Leu Phe Ala Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln
 325 330 335
 Lys Gly Val Asp Ile Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Ile Leu Ala Thr
 340 345 350
 Pro Lys Val Gln Ile Ala Ile Leu Gly Thr Gly Lys Ala Ala Tyr Glu
 355 360 365
 Lys Leu Val Asn Ala Ile Gly Thr Lys Tyr Lys Gly Arg Ala Lys Gly
 370 375 380
 Val Val Lys Phe Ser Ala Pro Leu Ala His Met Leu Thr Ala Gly Ala
 385 390 395 400
 Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Ile Gln
 405 410 415
 Leu His Ala Met His Tyr Gly Thr Val Pro Val Val Ala Ser Thr Gly
 420 425 430
 Gly Leu Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Val Thr Gly Phe His Met Gly
 435 440 445
 Ala Leu Asn Pro Asp Lys Leu Asp Glu Ala Asp Ala Asp Ala Leu Ala
 450 455 460

Ala Thr Val Arg Arg Ala Ser Glu Val Phe Ala Gly Gly Arg Tyr Pro
465 470 475 480

Glu Met Val Ala Asn Cys Ile Ser Gln Asp Leu Ser Trp Ser Lys Pro
485 490 495

Ala Gln Lys Trp Glu Gly Leu Leu Glu Glu Val Val Tyr Gly Lys Gly
500 505 510

Gly Val Ala Thr Ala Lys Lys Glu Glu Ile Lys Val Pro Val Ala Glu
515 520 525

Lys Ile Pro
530

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N9/10 C12N15/54 C12N15/62 C12Q1/68
C12N1/21 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, MEDLINE, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 14601 A (EXSEED GENETICS L L C) 9 April 1998 (1998-04-09) cited in the application	1-8, 10-19
Y	the whole document	3,9
X	ISSHIKI M. ET AL.: "A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to mutation at the 5' splice site of the first intron." PLANT J 1998 JUL;15(1):133- XP002130227 the whole document	1,2,4, 6-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2000

Date of mailing of the international search report

13/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No
PCT/FR 00/01384

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE SWISSPROT 'Online! 1 August 1998 (1998-08-01) D'HULST, C., ET AL. : "cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae Chlamydomonas reinhardtii" XP002146121 accession no. 064925</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,9
Y	<p>DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'Online! 2 June 1998 (1998-06-02) D'HULST, C., ET AL. : "cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae Chlamydomonas reinhardtii" XP002146137 accession no. AF026420</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,9
A	<p>DEL RUE B ET AL: "WAXY CHLAMYDOMONAS REINHARDTII: MONOCELLULAR ALGAL MUTANTS DEFECTIVE IN AMYLOSE BIOSYNTHESIS AND GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE ACTIVITY ACCUMULATE A STRUCTURALLY MODIFIED AMYLOPECTIN" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 174, no. 11, 1 June 1992 (1992-06-01), pages 3612-3620, XP000673929 ISSN: 0021-9193 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-19
A	<p>WO 97 45545 A (LUETTICKE STEPHANIE ; BLOCK MARTINA (DE); KOSSMANN JENS (DE); LOERZ) 4 December 1997 (1997-12-04) page 3 -page 4</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-19
A	<p>CHEN, L., ET AL.: "IMPROVED ADSORPTION TO STARCH OF A BETA-GALACTOSIDASE FUSION PROTEIN CONTAINING THE STARCH-BINDING DOMAIN FROM ASPERGILLUS GLUCOAMYLASE" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 7, 1991, pages 225-229, XP002056940 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-19
A	<p>KUSNADI, A.R., ET AL.: "FUNCTIONAL STARCH-BINDING DOMAIN OF ASPERGILLUS GLUCOAMYLASE I IN ESCHERICHIA COLI" GENE, vol. 127, 1993, pages 193-197, XP002056413 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-19
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/01384

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MU-FORSTER, C., ET AL.: "PHYSICAL ASSOCIATION OF STARCH BIOSYNTHETIC ENZYMES WITH STARCH GRANULES OF MAIZE ENDOSPERM" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 111, 1996, pages 821-829, XP002056414 the whole document	I-19
A	DAUVILLEE D. ET AL.: "Novel, starch-like polysaccharides are synthesized by an unbound form of granule-bound starch synthase in glycogen-accumulating mutants of chlamydomonas reinhardtii." PLANT PHYSIOL 1999 JAN;119(1):321-30, XP000879046 the whole document	1-19
A	MADDELEIN ML. ET AL.: "toward an understanding of the biogenesis of the starch granule - determination of the granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 40, 1994, pages 25150-25157, XP002130229 cited in the application the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01384

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9814601 A	09-04-1998	AU 4803097 A	24-04-1998
		BR 9713242 A	18-01-2000
		CN 1239514 A	22-12-1999
		EP 0935665 A	18-08-1999
WO 9745545 A	04-12-1997	DE 19621588 A	04-12-1997
		DE 19636917 A	12-03-1998
		AU 3030297 A	05-01-1998
		BR 9709487 A	10-08-1999
		CN 1219970 A	16-06-1999
		CZ 9803890 A	17-02-1999
		EP 0907741 A	14-04-1999
		SK 163698 A	13-04-1999
		ZA 9704657 A	30-11-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Je Internationale No

PCT/FR 00/01384

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/82 C12N9/10 C12N15/54 C12N15/62 C12Q1/68 C12N1/21 A01H5/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C12Q A01H		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EP0-Internal, MEDLINE, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 14601 A (EXSEED GENETICS L L C) 9 avril 1998 (1998-04-09) cité dans la demande	1-8, 10-19
Y	le document en entier ---	3,9
X	ISSHIKI M. ET AL.: "A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to mutation at the 5' splice site of the first intron." PLANT J 1998 JUL;15(1):133- XP002130227 le document en entier --- -/--	1,2,4, 6-8
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 31 août 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 13/09/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Holtorf, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No

PCT/FR 00/01384

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DATABASE SWISSPROT 'en ligne! 1 août 1998 (1998-08-01) D'HULST, C., ET AL. : "cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae Chlamydomonas reinhardtii" XP002146121 accession no. 064925</p>	3,9
Y	<p>DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'en ligne! 2 juin 1998 (1998-06-02) D'HULST, C., ET AL. : "cloning of the cDNA encoding for the GBSSI in the green algae Chlamydomonas reinhardtii" XP002146137 accession no. AF026420</p>	3,9
A	<p>DELRUE B ET AL: "WAXY CHLAMYDOMONAS REINHARDTII: MONOCELLULAR ALGAL MUTANTS DEFECTIVE IN AMYLOSE BIOSYNTHESIS AND GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASEACTIVITY ACCUMULATE A STRUCTURALLY MODIFIED AMYLOPECTIN" JOURNAL OF BACTERIOLOGY,US,WASHINGTON, DC, vol. 174, no. 11, 1 juin 1992 (1992-06-01), pages 3612-3620, XP000673929 ISSN: 0021-9193 cité dans la demande le document en entier</p>	1-19
A	<p>WO 97 45545 A (LUETTICKE STEPHANIE ;BLOCK MARTINA (DE); KOSSMANN JENS (DE); LOERZ) 4 décembre 1997 (1997-12-04) page 3 -page 4</p>	1-19
A	<p>CHEN, L., ET AL.: "IMPROVED ADSORPTION TO STARCH OF A BETA-GALACTOSIDASE FUSION PROTEIN CONTAINING THE STARCH-BINDING DOMAIN FROM ASPERGILLUS GLUCOAMYLASE" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 7, 1991, pages 225-229, XP002056940 le document en entier</p>	1-19
A	<p>KUSNADI, A.R., ET AL.: "FUNCTIONAL STARCH-BINDING DOMAIN OF ASPERGILLUS GLUCOAMYLASE I IN ESCHERICHIA COLI" GENE, vol. 127, 1993, pages 193-197, XP002056413 le document en entier</p>	1-19

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 00/01384

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MU-FORSTER, C., ET AL. : "PHYSICAL ASSOCIATION OF STARCH BIOSYNTHETIC ENZYMES WITH STARCH GRANULES OF MAIZE ENDOSPERM" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 111, 1996, pages 821-829, XP002056414 le document en entier	1-19
A	DAUVILLEE D. ET AL.: "Novel, starch-like polysaccharides are synthesized by an unbound form of granule-bound starch synthase in glycogen-accumulating mutants of chlamydomonas reinhardtii." PLANT PHYSIOL 1999 JAN;119(1):321-30, XP000879046 le document en entier	1-19
A	MADDELEIN ML. ET AL.: "toward an understanding of the biogenesis of the starch granule - determination of the granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 40, 1994, pages 25150-25157, XP002130229 cité dans la demande le document en entier	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der de Internationale No

PCT/FR 00/01384

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
W0 9814601 A	09-04-1998	AU 4803097 A	24-04-1998
		BR 9713242 A	18-01-2000
		CN 1239514 A	22-12-1999
		EP 0935665 A	18-08-1999
W0 9745545 A	04-12-1997	DE 19621588 A	04-12-1997
		DE 19636917 A	12-03-1998
		AU 3030297 A	05-01-1998
		BR 9709487 A	10-08-1999
		CN 1219970 A	16-06-1999
		CZ 9803890 A	17-02-1999
		EP 0907741 A	14-04-1999
		SK 163698 A	13-04-1999
		ZA 9704657 A	30-11-1998